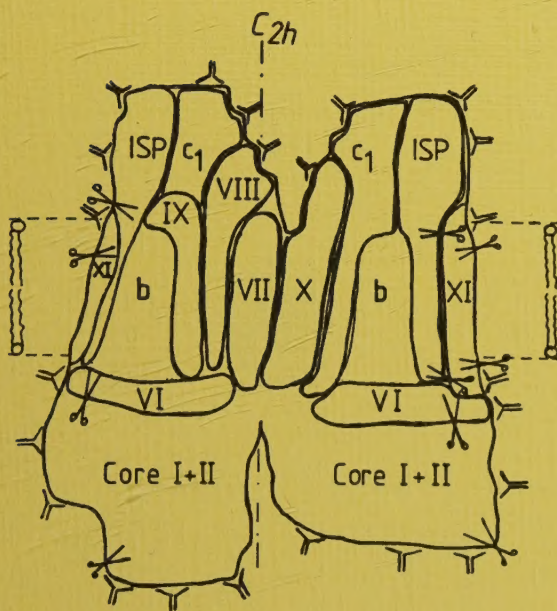


ZUR STRUKTUR DES MITOCHONDRIALEN bc_1 - KOMPLEXES



THOMAS ANDREAS LINK

Disbui. München

1988



Zur Struktur des mitochondrialen bc_1 -Komplexes

**Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Thomas Andreas Link
aus Frankfurt/Main**

München

1988

Dissertation eingereicht am 16. Juni 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. von Jagow
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 1988

... und bei einer solchen Arbeit kann es nur ein Ziel sein: die Gewinnung der Wahrheit. Die Arbeit ist nicht nur eine geistige, sondern auch eine körperliche. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt.

... und bei einer solchen Arbeit kann es nur ein Ziel sein: die Gewinnung der Wahrheit. Die Arbeit ist nicht nur eine geistige, sondern auch eine körperliche. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt.

Meinen Eltern

... und bei einer solchen Arbeit kann es nur ein Ziel sein: die Gewinnung der Wahrheit. Die Arbeit ist nicht nur eine geistige, sondern auch eine körperliche. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt.

... und bei einer solchen Arbeit kann es nur ein Ziel sein: die Gewinnung der Wahrheit. Die Arbeit ist nicht nur eine geistige, sondern auch eine körperliche. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt. Sie ist eine Arbeit, die die ganze Persönlichkeit in Anspruch nimmt.

Zuerst und vor allen danke ich Herrn Prof. Dr. G. von Jagow für die Betreuung, für seine in jeder Hinsicht großzügige Unterstützung der Arbeiten und für die stete Anteilnahme und Diskussionsbereitschaft. Ohne ihn wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin danke ich meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe: Herrn Dr. W.D. Engel für die Einführung in die Geheimnisse der Biochemie; Herrn Dr. H. Schägger für zahlreiche wertvolle Hinweise aus seiner intimen Kenntnis des Eigenlebens von Hydroxyapatitsäulen und Polyacrylamidgelen und für anregende Seminare; und Herrn Dipl.-Biochem. U. Brandt für die nicht immer leichte, aber stets freundschaftliche und gute Zusammenarbeit, auch bei der Aufbereitung und Analyse von Naturstoffen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die immer bereitwillig gewährte Unterstützung und das freundliche und angenehme Arbeitsklima: Fräulein C. Michalski für viele hilfreiche Tips, die geschickte und erfahrene Durchführung der Dissoziationsversuche und einiger immunologischer Experimente; Fräulein U. Linner für lange Zusammenarbeit und die geduldige Ausführung der Proteaseverdauserien; Fräulein B. Roth für photographische Arbeiten; und Frau I. Prinz für die unermüdliche, kühle Präparation der Rinderherzmitochondrien.

Herrn Prof. Dr. E.M. Klingenberg danke ich für die guten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Physikalische Biochemie. Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern der Werkstatt Herrn H. Berger, Herrn W. Oellerer und Herrn H. Nakel für tatkräftige Unterstützung bei der Lösung technischer Probleme und Frau C. Sieghart für die Überarbeitung englischer Manuskripte und ihre Bemühungen um das leibliche Wohl der Abteilung.

Den Praktikanten S. Klostermann, S. Hennig und T. Ilg danke ich für ihre interessierte Mitarbeit.

Ferner danke ich Herrn Dr. Mewes vom MPI für Biochemie, Martinsried, für die Durchführung der Aminosäureanalysen und Frau Dr. Tomoko Ohnishi, Philadelphia, sowie den Herren Prof. Dr. Bernard L. Trumpower, Hanover NH, U.S.A., und Prof. Dr. W. Neupert, München, für die freundliche Überlassung unveröffentlichter Daten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Erwin-Riesch-Stiftung und der Gesellschaft für Biologische Chemie danke ich für ihre Unterstützungen zur Teilnahme an internationalen Kongressen. Der Gedankenaustausch mit bedeutenden Wissenschaftlern aus aller Welt hat sich als außerordentlich wertvoll und befruchtend erwiesen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretischer Teil:	
Strukturvorhersagen von Membranproteinen	3
2.1 Methoden	6
2.2 Anwendung	7
2.2.1 Mitochondriale Carrierproteine	9
2.2.2 bc_1 -Komplex	10
2.2.2.1 Cytochrom b	12
2.2.2.2 Cytochrom c_1	26
2.2.2.3 Eisen-Schwefel-Protein (ISP)	28
2.2.2.4 Untereinheiten ohne Redoxzentren	36
2.2.2.5 Strukturprinzipien	47
3. Experimenteller Teil	51
3.1 Material und allgemeine Methoden	52
3.1.1 Material	52
3.1.2 Präparative Methoden	52
3.1.3 Analytische Methoden	54
3.1.4 Enzymatische Tests	55
3.2 Immunologische Experimente	56
3.2.1 Methoden	56
3.2.1.1 Gewinnung von IgG	56
3.2.1.2 Immunoblotting	57
3.2.1.3 Immunopräzipitation	59

3.2.2 Ergebnisse	61
3.2.2.1 Charakterisierung der IgG	61
3.2.2.2 Vergleichende Immunoblots	68
3.3 Dissoziationsexperimente	72
3.3.1 Methoden	72
3.3.2 Ergebnisse	73
3.4 Proteolytischer Verdau	83
3.4.1 Methoden	83
3.4.2 Ergebnisse	85
3.5 Isolierung eines löslichen Eisen-Schwefel-Protein-Fragments	94
3.5.1 Methoden	94
3.5.2 Ergebnisse	95
4. Diskussion	101
5. Zusammenfassung	109
6. Literaturverzeichnis	111
Anhänge I - IV	

1. Einleitung

Die bc-Komplexe sind die zentralen Komponenten der Elektronentransportketten in respiratorischen und photosynthetischen Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien (Abb. 1; Übersichtsartikel s. Hauska et al., 1983; von Jagow et al., 1987). Die Komplexe sind integrale, membranständige Multiproteinkomplexe und erfüllen alle die gleiche Funktion, die Übertragung von zwei Elektronen von einem Hydrochinon als Elektronendonator auf die jeweiligen Elektronenakzeptoren Cytochrom c bzw. Plastocyanin (Übersichtsartikel s. Rich, 1984; Berry & Trumpower, 1985; Crofts, 1985; von Jagow et al., 1986). Bei diesem Elektronentransport werden $2\text{ H}^+/\text{e}^-$ über die energiewandelnden Membranen transportiert, so daß als Ergebnis des Elektronentransportes ein

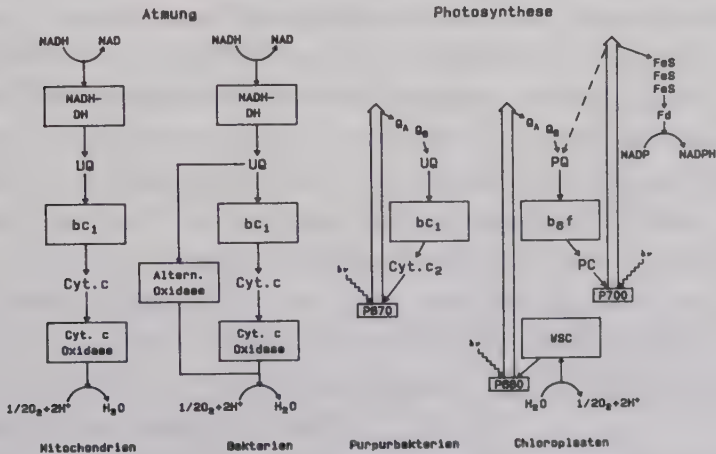


Abb. 1: Die bc_1 -Komplexe als zentrale Komponenten verschiedener Elektronentransportketten.



chemiosmotisches Membranpotential entsteht, das die Kopplung der exergonen und endergonen Prozesse an der Membran bewirkt (Mitchell, 1961).

Ebenfalls gemeinsam sind allen bc-Komplexen die an der Elektronenübertragung beteiligten vier Redoxzentren, die sich in einen Weg mit hohem Redoxpotential ("high-potential") und einen Weg mit niedrigem Redoxpotential ("low-potential") teilen: den "high-potential"-Weg, der auf der positiven Seite der Membran angeordnet ist, bilden ein Ferredoxin-Typ Eisen-Schwefel-Protein mit einem Zwei-Eisen-zwei-Schwefel-Zentrum sowie ein c-Typ Cytochrom (Cytochrom c_1 oder Cytochrom f), während der "low-potential"-Weg, der transmembran verläuft, von zwei Häm b-Zentren gebildet wird, die beide Bestandteil eines einzigen Cytochrom b-Polypeptids sind (von Jagow et al., 1986).

2. Theoretischer Teil: Strukturvorhersagen von Membranproteinen

Die Vorhersage von Proteinstrukturen aus der Aminosäuresequenz ist eine Methode, die in den vergangenen Jahren stetig zunehmendes Interesse gefunden hat, insbesondere seitdem die Zahl der aus DNA-Sequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen stark angestiegen ist. Während für die Vorhersage der Strukturen von wasserlöslichen, globulären Proteinen verschiedene statistische Ansätze existieren (so eingeschränkt deren Anwendbarkeit auch ist), fehlen solche statistischen Methoden für Membranproteine mangels einer breiten Datenbasis, da bisher erst von einem Membranprotein, dem bakteriellen Photoreaktionszentrum, die hochaufgelöste Kristallstruktur bekannt ist (Deisenhofer et al., 1985).

Die Grundlage für die Strukturvorhersage von Membranproteinen bilden daher theoretische Überlegungen, daß (a) eine Wechselwirkung von hydrophoben Aminosäureresten mit dem hydrophoben inneren Bereich einer Phospholipiddoppelschicht energetisch am günstigsten ist, und daß (b) in einer α -helicalen Struktur die Wasserstoffbrückenbindungen der Polypeptidkette abgesättigt sind. Als Schlußfolgerung daraus wurde angenommen, daß die hydrophoben Bereiche von Membranproteinen transmembrane α -Helices bilden sollten, was sich z.B. in der niedrig-aufgelösten Struktur des Membranproteins Bacteriorhodopsin bestätigte. Die Vorhersage dieser Bereiche erfolgt in der Regel nach der Methode von Kyte & Doolittle (1982), indem die gemittelte "Hydropathie" von linearen Abschnitten der Sequenz gebildet und graphisch über der Sequenzposition aufgetragen wird.

Diese Methode hat sich bei der Analyse zahlreicher Membranproteine als wertvoll erwiesen, erlaubt aber keine Vorhersage sogenannter amphipathischer Helices, bei denen ein Segment oder

ein Teil des Umfangs der Helixoberfläche hydrophob und der andere hydrophil ist (Abb. 2). Diese Verteilung der Reste führt zu einem neutralen (d.h. weder hydrophoben noch hydrophilen) gemittelten Hydropathiewert des gesamten Abschnittes. Daß amphipathische Helices ein wichtiges Strukturelement zumindest einiger Klassen von Membranproteinen darstellen können, zeigt die Analyse zahlreicher Membranproteine.

Der folgende Teil der Arbeit beschreibt daher eine selbst entwickelte graphische Methode zur Vorhersage von amphipathischen Strukturen ("sided hydropathy plot") und ihre Anwendung auf den mitochondrialen bc_1 -Komplex.

Die gelegentlich in der Literatur zu findende Vorhersage der Strukturen von Membranproteinen mittels statistischer Methoden, die für globuläre Proteine entwickelt worden sind, ist unzulässig (vgl. Wallace et al., 1986), da sich der Aufbau von Membranproteinen und globulären Proteinen grundsätzlich unterscheidet: Bei wasserlöslichen globulären Proteinen bilden die hydrophoben Bereiche, oft als β -Faltblätter, den Kern des Proteins,

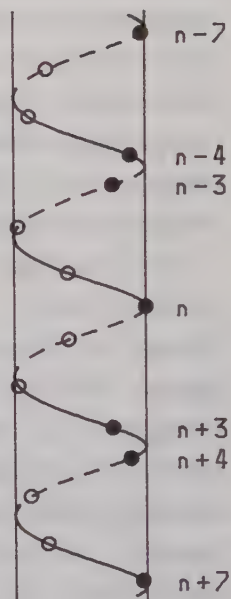
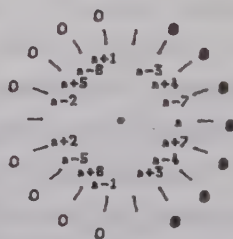


Abb. 2: Ansicht und "helical wheel plot" einer amphipathischen Helix. Die hydrophoben Reste, die auf einer Seite der Helix liegen, werden durch geschlossene Kreise symbolisiert, die hydrophilen Reste durch offene Kreise.



während die hydrophilen Bereiche die Oberfläche des Proteins darstellen und häufig als (amphipathische) α -Helices vorliegen. Bei Membranproteinen bilden die hydrophoben Bereiche α -Helices, die mit der umgebenden Phase, den Phospholipidseitenketten, Kontakt haben, während die hydrophilen Bereiche, soweit in der Membran befindlich, im Inneren des Proteins verborgen sind.

Tabelle 1: Vergleich der Hydropathie-Indices nach Kyte & Doolittle (1982) mit der Klassifizierung der Helix-Bildner nach Chou & Fasman (1974).

Aminosäurerest	Helix-Parameter (Chou & Fasman)	Hydropathie-Index (Kyte & Doolittle)
Glutaminsäure	H	-3.5
Alanin	H	1.8
Leucin	H	3.8
Histidin	h	-3.2
Methionin	h	1.9
Glutamin	h	-3.5
Tryptophan	h	-0.9
Valin	h	4.2
Phenylalanin	h	2.8
Lysin	I	-3.9
Isoleucin	I	4.5
Asparaginsäure	i	-3.5
Threonin	i	-0.7
Serin	i	-0.8
Arginin	i	-4.5
Cystein	i	2.5
Asparagin	b	-3.5
Tyrosin	b	-1.3
Prolin	B	-1.6
Glycin	B	-0.4

Die Aminosäuren sind nach absteigendem α -Helix-Parameter P_{α} geordnet. Zuordnung: H,h: Helix-Bildner; I,i; indifferent; b,B: Helix-Brecher.

Die prinzipiellen Unterschiede im Aufbau der zwei Klassen von Proteinen erklären, warum transmembrane α -Helices beispielsweise mit den Vorhersagemethoden für wasserlösliche Proteine nicht erkannt werden können. Dies zeigt sich auch bei einem Vergleich der Hydropathie-Parameter nach Kyte & Doolittle mit den Sekundärstrukturparametern nach Chou & Fasman (1974): nur 2 der 7 hydrophobsten Aminosäuren erweisen sich in der für wasserlösliche Proteine ermittelten Statistik als starke α -Helixbildner (Tabelle 1).

2.1 Methoden

Alle Programme wurden in BASIC für einen Kontron PSI 80 Rechner mit einem Graphtec MP 1000 Plotter geschrieben.

Hydropathie-Plots erfolgten nach Kyte & Doolittle (1982), deren Hydropathie-Indices durchgehend verwendet wurden.

Ähnlichkeitsmatrizen wurden wie folgt erhalten: Für Segmente von jeweils 7 Aminosäuren zweier Sequenzen wurden die mittleren Ähnlichkeitskoeffizienten unter Verwendung der "mutation data scoring matrix" MDM₇₈ von Schwartz & Dayhoff (1978) gebildet. Die Verteilung aller Werte ($N \approx 140\ 000$ für Cytochrom b, $\approx 55\ 000$ für Cytochrom c₁ und $\approx 36\ 000$ für die Eisen-Schwefel-Proteine) folgte einer Gauss-Verteilung, so daß Mittelwert und Standardabweichung gebildet werden konnten (Wieland et al., 1984). Die zu vergleichenden Sequenzen wurden durch Einfügen von Leerstellen auf maximale Homologie ausgerichtet. Für jeweils zwei Sequenzen wurden dann die Ähnlichkeitskoeffizienten gemittelt und in Vielfache der Standardabweichung umgerechnet.

Die Darstellung von sogenannten "helical wheels" (axialer Projektionen der Helices) erfolgte nach Schiffer & Edmundson (1967).

Alle anderen Strukturvorhersagen wurden so angewandt, wie sie in der jeweiligen Literaturstelle beschrieben werden.

Die "sided hydropathy"-Werte (seitenspezifische, d.h. topologisch gemittelte Hydropathie-Indices) von amphipathischen α -Helices und β -Faltblättern wurden durch Mittelung der Hydropathie-Indices folgender Reste mit den in Klammern angegebenen Wichtungen erhalten:

- Gewichtetes Mittel: n (1.0), n $\pm$ 1 (0.5), n $\pm$ 2 (0.5), n $\pm$ 3 (0.5);
- "Sided" α -Helix: n (1.0), n $\pm$ 3 (0.5) (Abstand 1 Steigung, 40°), n $\pm$ 4 (0.5) (Abstand 1 Steigung, 60°), n $\pm$ 7 (0.5) (Abstand 2 Steigungen, 20°);
- "Sided" β -Faltblatt: n (1.0), n $\pm$ 2 (1.0), n $\pm$ 4 (0.5).

Auf diese Weise wurden pro Rest drei Werte erhalten und über der Sequenzposition aufgetragen.

2.2 Anwendung

Durch den Vergleich der drei verschiedenen Profile in den "sided" Hydropathie-Auftragungen von Membranproteinen lassen sich verschiedene mögliche Sekundärstrukturen identifizieren:

- (i) Gebiete hoher gemittelter Hydropathie, die in der Regel nur geringe Schwankungen in den "sided" Hydropathie-Profilen zeigen; diese Bereiche des Proteins werden als "klassische" hydrophobe transmembrane α -Helices vorhergesagt.
- (ii) Gebiete mit niedriger gemittelter Hydropathie, aber großen Fluktuationen in der "sided"- α -Helix-Auftragung mit einer Frequenz von ca. 3.5 Resten. Diese Gebiete zeigen an, daß in der Aminosäuresequenz hydrophobe und hydrophile Reste miteinander abwechseln, und zwar so, daß jede dritte bis vierte

Aminosäure wieder die gleiche Polarität (hydrophob/hydrophil) hat, entsprechend der Struktur einer amphipathischen Helix (3.6 Reste pro Umdrehung).

Diese Bereiche des Proteins werden als amphipathische α -Helices vorhergesagt. Amphipathische Helices ausreichender Länge (ca. 20 Reste) können entweder transmembran oder entlang der Membranoberfläche orientiert sein.

- (iii) Gebiete mit niedriger gemittelter Hydropathie und niedriger "sided"- α -helicaler Hydropathie, aber großen Fluktuationen im "sided"- β -Faltblatt-Profil mit einer Frequenz von 2.

Diese Bereiche werden als amphipathische β -Faltblätter vorhergesagt. Da die Existenz von membranüberspannenden β -Faltblättern bisher nur für Porin nachgewiesen ist, bei dem sich diese Struktur auch im "sided"-Hydropathie-Plot zeigen läßt (Kleene et al., 1987; Abb. 3), ist es unklar, inwieweit amphipathische β -Faltblätter als transmembran angenommen werden können.

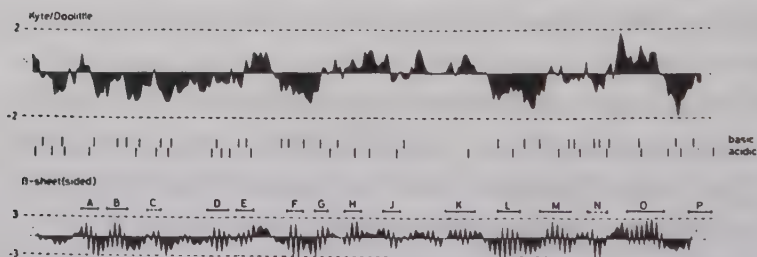


Abb. 3: "Sided"-Hydropathie-Plot von Porin aus *N. crassa* (Kleene et al., 1987).

2.2.1 Mitochondriale Carrierproteine

Die drei bisher sequenzierten Carrier aus der inneren mitochondrialen Membran (ADP/ATP-Carrier, Phosphat-Carrier und "Uncoupling" Protein) gehören zu einer homologen Proteinfamilie (Aquila et al., 1987); ihre Aminosäuresequenzen zeigen alle eine dreifach intern replizierte Struktur. Aus einer Hydropathie-Analyse leiteten Saraste & Walker (1982) 6 Membran-überspannende Helices für den ADP/ATP-Carrier aus Rinderherzmitochondrien ab; dieser Wert stimmt mit CD-spektroskopischen Messungen gut überein. Ihre Vorhersage erfolgte jedoch nicht unter strenger Einhaltung der Regeln von Kyte & Doolittle, da die Anforderung für eine Membran-überspannende Helix ein mittlerer Hydropathie-Wert

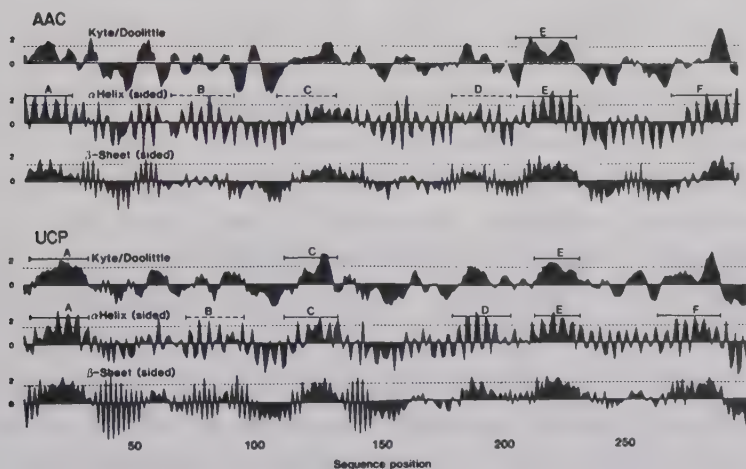


Abb. 4: "Sided"-Hydropathie-Plot des ADP/ATP-Carriers aus Rinderherz (AAC) und des "Uncoupling"-Proteins aus dem braunen Fettgewebe des Hamsters (UCP)(Aquila et al., 1985).

von 1.6 über ein Segment von 19 Resten ist, und dieser Wert nur von einer der sechs Helices des ADP/ATP-Carriers erreicht wird. Im Hydropathie-Plot kann ein Teil der 6 Helices überhaupt nur aus der Homologie innerhalb der Sequenz abgeleitet werden.

Eine Analyse mit Hilfe der eigenen "sided"-Hydropathie-Auftragung zeigt jedoch alle 6 möglichen Membran-überspannenden Helices (Abb. 4), von denen 3 einen stark amphipathischen Charakter haben (Aquila et al., 1985). Die "sided"-Hydropathie-Muster sind in den homologen Proteinen stark konserviert; offensichtlich besitzen diese Proteine trotz ihrer unterschiedlichen Funktion eine sehr ähnliche Struktur in der Membran, die sich aus der Wechselwirkung zwischen hydrophoben und amphipathischen Helices ergibt (Aquila et al., 1987).

2.2.2 bc₁-Komplex

Die bc-Komplexe sind Multiproteinkomplexe, die im Laufe der Evolution an Komplexität zugenommen haben (Tabelle 2). Allen bc-Komplexen sind drei Untereinheiten gemeinsam, die die vier Redoxzentren enthalten: Cytochrom b (mit zwei Hämzentren), Cytochrom c₁ und das "Rieske"-Eisen-Schwefel-Protein. Diese "katalytischen" Proteine sind in allen bisher bekannten Systemen stark konserviert. Eine Besonderheit stellt der b₆f-Komplex dar, bei dem das Cytochrom b-Polypeptid in zwei Polypeptidketten aufgespalten ist, das sogenannte Cytochrom b₆ und ein "17 kDa"-Protein. Außerdem ist, wie der Name "b₆f-Komplex" sagt, das Cytochrom c₁ durch das nicht homologe, aber funktionell verwandte Cytochrom f ersetzt.

Tabelle 2: Vergleich der Untereinheiten- (UE-) Zusammensetzung verschiedener bc-Komplexe.

Archaeobakterien	Eubakterien		Pflanzen	Pilze	Säugetiere		UE
<i>Sulfolobus</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Rhodobacter</i>	Spinat	Hefe	Rind		
			Chloroplasten	Mitochondrien			
				Core I	Core I	1	
				Core II	Core II	2	
?	Cyt. b	Cyt. b	Cyt. b ₆	Cyt. b	Cyt. b	3	
?	Cyt. c ₁	Cyt. c ₁	Cyt. f	Cyt. c ₁	Cyt. c ₁	4	
ISP	ISP	ISP	ISP	ISP	ISP	5	
			15.0 kDa	14.4 kDa	13.4 kDa	6	
			?	12.3 kDa	9.5 kDa	7	
			?	14.5 kDa	9.2 kDa	8	
			?	?	8.0 kDa	9	
				7.3 kDa	7.2 kDa	10	
					6.4 kDa	11	

Die "17 kDa"-Untereinheit (nach dem Laufverhalten im SDS-Gel; wirkliche Masse 15.0 kDa) des pflanzlichen b₆f-Komplexes ist homolog zum C-terminalen Ende des Cytochrom b. In Archaeobakterien wurde ein Eisen-Schwefel-Zentrum entdeckt, dessen ESR-Signale denen des "Rieske"-ISP gleichen; die Existenz eines bc-Komplexes ist jedoch unklar.

Bei den nicht-bakteriellen Systemen findet sich eine größere Anzahl von Untereinheiten ohne Redoxzentren, so daß die Gesamtzahl der Proteine von 3 (bei Bakterien) bis auf 11 (in Säugetieren, z.B. im Rinderherz) ansteigt. Die Sequenzen von 9 der 11 Untereinheiten des bc₁-Komplexes aus Rinderherz wurden bisher proteinchemisch bestimmt oder aus der DNA-Sequenz abgeleitet; vom bc₁-Komplex aus Hefe liegen die Sequenzen von 9 der 10 Untereinheiten vor. In der folgenden Analyse der Proteinstrukturen soll der Versuch unternommen werden, aus diesen

Daten ein Bild der Gesamtstruktur des Komplexes abzuleiten (s. Link et al., 1987).

2.2.2.1 Cytochrom b

Die Aminosäuresequenzen des Cytochrom b aus 17 verschiedenen Organismen wurden bisher aus den DNA-Sequenzen abgeleitet. Eine "Ähnlichkeitsmatrix" dieser Sequenzen zeigt Abb. 5. Der Vergleich der verschiedenen Sequenzen einschließlich der des (kürzeren) Cytochrom b_6 ermöglichte frühzeitig die Identifikation von 4 Histidinen, die paarweise in zwei vorhergesagten Membran-überspannenden Helices vorkommen (Helix II und V) und offenbar die fünften und sechsten Liganden der zentralen Eisen-Atome der beiden Häm-Systeme darstellen (Widger et al., 1984). Im Gegensatz zu den Häm-Systemen in c-Typ Cytochromen sind die b-Typ Häm-Systeme nicht-kovalent gebunden.

Das aus den Sequenzvergleichen und aus den Hydrophobizitätsanalysen abgeleitete ursprüngliche Bild des Cytochrom b mit 9 Membran-überspannenden Helices, zwischen denen die beiden Häm-Zentren in einer transmembranen Anordnung liegen (Widger et al., 1984; Saraste, 1984) wurde in zwei Aspekten modifiziert:

1. durch das Modell eines "4- α -helicalen Bündels" aufgrund einer genaueren Analyse der Umgebung der Häm-bindenden Regionen (Link et al., 1986);
2. durch Verlegung der amphipathischen Helix IV an die Oberfläche des Komplexes zu einem 8-Helix-Modell, das mit den neuesten Daten der Inhibitor-resistenten Mutanten besser vereinbar erscheint (Abb. 6)(Crofts et al., 1987).

	Me	Ri	Ma	Ra	Kr	Dr	As	Ne	Sa	Ma	Pa	Rh	Le	Ta	Sp	Tr
Mensch		4.63	4.63	4.58	4.19	4.05	3.51	3.51	3.35	3.18	3.04	3.02	2.15	2.11	2.11	1.71
Rind	298		4.83	4.79	4.34	4.25	3.50	3.46	3.39	3.31	3.04	3.04	2.16	2.11	2.12	1.72
Maus	296	320		5.13	4.41	4.31	3.56	3.52	3.38	3.33	3.06	3.02	2.18	2.14	2.16	1.60
Ratte	295	317	358		4.38	4.29	3.54	3.52	3.41	3.34	3.05	3.02	2.18	2.14	2.17	1.64
Kröte	267	283	287	288		4.15	3.32	3.28	3.20	3.09	2.95	2.87	2.03	1.99	1.98	1.51
<i>Drosophila</i>	231	253	254	255	253		3.46	3.44	3.46	3.35	3.01	3.00	2.16	2.10	2.11	1.69
<i>Aspergillus</i>	198	208	210	208	201	203		4.61	3.86	3.21	3.02	2.93	2.28	2.26	2.25	1.77
<i>Neurospora</i>	200	203	204	204	195	202	318		3.80	3.16	3.05	2.93	2.25	2.21	2.21	1.74
<i>Saccharomyces</i>	188	194	187	191	183	201	232	227		3.21	3.06	2.96	2.10	2.05	2.04	1.71
Mais (m)	187	194	197	197	190	195	192	191	187		3.01	2.92	2.17	2.15	2.13	1.61
<i>Paracoccus</i>	177	182	179	179	176	183	193	190	186	190		4.91	1.93	1.91	1.91	1.54
<i>Rhodobacter</i>	176	189	178	179	178	182	191	183	181	186	361		1.90	1.88	1.89	1.54
Lebermoos (c)	108	106	109	108	107	101	115	112	98	107	102	105		5.09	4.81	1.33
Tabak (c)	103	102	107	105	103	96	115	110	93	106	98	103	336		4.78	1.31
Spinat (c)	101	103	106	104	99	97	112	110	92	105	98	103	314	322		1.33
<i>Trypanosoma</i>	84	86	79	82	79	80	87	82	76	84	76	79	58	56	55	

Abb. 5:

Ähnlichkeitsmatrix des Cytochrom b aus 16 verschiedenen Spezies.

Unteres linkes Dreieck: Anzahl identischer Aminosäuren nach Ausrichtung der Sequenzen; oberes rechtes Dreieck: Ähnlichkeit in Standardabweichungen (σ).
Bei den Pflanzen kommt Cytochrom b sowohl in Mitochondrien (m) als auch in Chloroplasten (c); als Cytochrom $b_6 + "17 \text{ kDa}"$ -Untereinheit) vor.

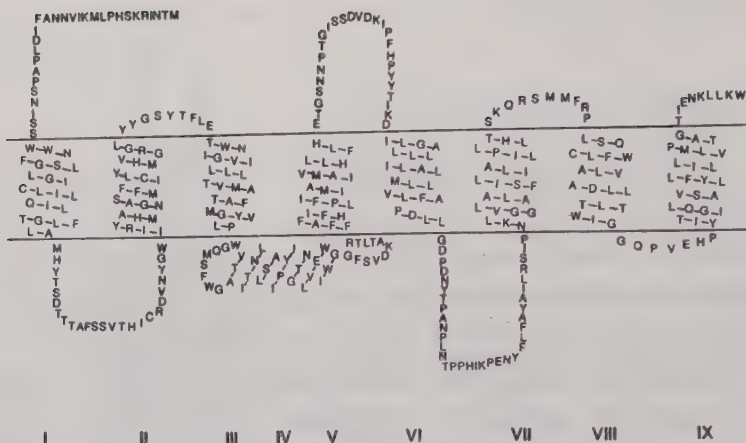


Abb. 6: Faltung des Rinderherz-Cytochrom b in der inneren Mitochondrienmembran nach dem 8-Helix-Modell. Die römischen Ziffern geben die vorhergesagten Helices an.

Die ursprüngliche Vorstellung von zwei streng antiparallel angeordneten Helices (II und V), zwischen denen die beiden Häm-Zentren mit einem Eisen-Eisen-Abstand von 21 Å liegen (Saraste, 1984), berücksichtigte nicht, daß Helix V einen konservierten Prolin-Rest enthält (Pro-186 in Rinderherz-Cytochrom b), der sich zwischen den beiden Häm-bindenden Histidinen (His-182 und His-196 in Rinderherz) befindet. Da die Geometrie des Prolins starr und nicht mit der Geometrie einer "idealen" α -Helix vereinbar ist, führt das Vorkommen von Prolin in einer α -Helix zu einer Störung der Struktur. Modellstudien mit CPK-Modellen zeigten, daß diese Störung entweder in einer Biegung oder in einer Verdrehung der Helix um ihre zentrale Achse bestehen kann. Die

Struktur der Wasserstoffbrückenbindungen der dem Prolin benachbarten Peptidgruppen bleibt um so stärker erhalten, je geringer die Biegung der Helix und je größer dafür die Verdrillung ist. Bei einer Verdrillung von -100° ist die Helix wieder gerade. Dies führt aber dazu, daß die beiden Häm-bindenden Histidine nicht übereinander auf der Oberfläche der Helix liegen, sondern daß ihre α -C-Atome einen Winkel von ca. 140° mit der Helixachse bilden (Abb. 7). Die Bindung der beiden Porphyrinringe in einer transmembranen Anordnung übereinander und senkrecht zur Membranoberfläche erfordert daher einen Winkel zwischen den Achsen der Helices II und V von ca. 20° . Dies jedoch entspricht dem Winkel, den die benachbarten Helices in einem "4- α -helicalen Bündel" miteinander bilden, einer Struktur, die aus zahlreichen Proteinen, einschließlich einiger Häm-enthaltender Proteine, bekannt ist (Weber & Salemme, 1980).

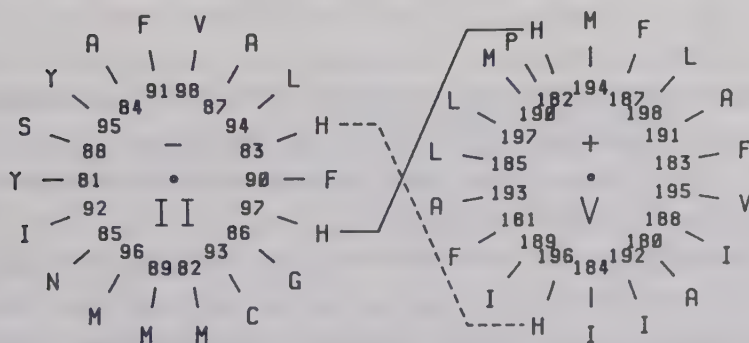


Abb. 7: "Helical wheel"-Darstellung der Helices II und V des Cytochrom b aus Rinderherz.

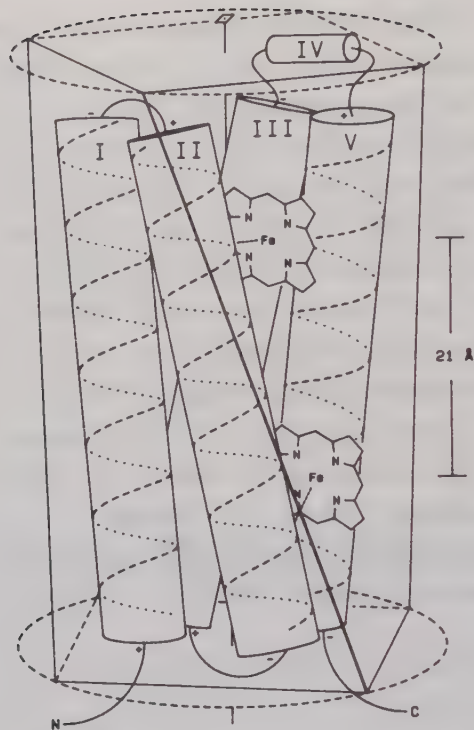


Abb. 8: Darstellung des 4- α -helicalen Bündels des Cytochrom b nach dem 8-Helix-Modell.
Die Darstellung entspricht der Version "D" in Abb. 13.
+ und - zeigen die Orientierung und das Dipolmoment der Helices (N-Termini = +).

Diese von uns für Cytochrom b vorgeschlagene Struktur (Abb. 8; Link et al., 1986) besteht aus 4 α -Helices, die in einem symmetrischen Bündel mit pseudo-vierfacher Symmetrieachse und einer linksgedrehten Verdrillung angeordnet sind. Der Winkel zwischen den Helixachsen beträgt ca. 18°, die Abstände zwischen

den Helices ca. 10 Å, der Durchmesser des gesamten Bündels ca. 30 Å. Die Anordnung wird durch elektrostatische Wechselwirkungen (Helix-Dipol-Dipol) zwischen den Helices stabilisiert. Die Porphyrinringe sind durch jeweils zwei Histidinreste als fünfte und sechste Liganden des zentralen Eisen sowie durch Wechselwirkungen zwischen ihren Propionylgruppen und drei Argininresten an den Enden der Helices II und V gebunden. Die Porphyrinringe liegen größtenteils zwischen den Helices verborgen; sie sind jedoch in der Spalte zwischen den Helices II und V teilweise zugänglich, so daß hier die zu postulierenden Reaktionsstellen, d.h. die Stellen für den Übertritt der Elektronen vom und zum Chinon, liegen könnten.

Die Existenz von 9 Membran-überspannenden Helices wurde aus "Hydropathie"-Plots nach Kyte & Doolittle abgeleitet, obwohl 3 der 9 vorhergesagten Helices (Helices II, IV und VIII) nicht den geforderten Schwellenwert, einen durchschnittlichen Hydropathie-Index von 1.6 für ein Segment von 19 Resten, erreichen (Tabelle 3). Diese drei Helices sind amphipathisch, d.h. ein Teil ihres Umfangs wird von hydrophilen Aminosäuren gebildet. Im Zusammenhang mit der Interpretation der neuesten Sequenzdaten von Mutanten, bei denen der Austausch einer einzigen Aminosäure eine Resistenz gegen bestimmte Inhibitoren bewirkt, ergab sich die Frage, ob alle neun vorhergesagten Helices tatsächlich Membran-überspannend sind, oder ob eine der amphipathischen Helices außerhalb bzw. an der Außenseite der Membran angeordnet ist. Die Annahme, daß Helix IV nicht Membran-überspannend ist, führt zu einem "8-Helix-Modell", bei dem alle Punktmutationen, die Resistenz gegen eine der funktionell verschiedenen Seiten des Enzyms zugeordneten Inhibitorklassen (von Jagow & Link, 1986) bewirken, auf der gleichen Seite der Membran liegen.

Tabelle 3: Vergleich verschiedener Vorhersagen der 9 Helices des Cytochrom b aus Rinderherz.

	(1)	(2)	(3)	(4)
I	30 - 52 a	35 - 53 2.28	33 - 53 0.75	29 - 55 S
II	78 - 105 h	78 - 96 1.04°	76 - 96 0.45	76 - 103 g
III	112 - 134 h	115 - 133 2.29	115 - 135 0.76	113 - 140 t2
IV	143 - 166 A	143 - 161 1.25°	149 - 169 0.56	143 - 170 S
V	178 - 202 a	181 - 201 2.38	179 - 199 0.87	175 - 202 t2
VI	229 - 250 H	229 - 247 2.92	229 - 249 0.85	226 - 252 t2
VII	286 - 307 H	288 - 307 2.59	288 - 308 0.82	282 - 309 t2
VIII	320 - 339 a	320 - 338 1.55°	323 - 343 0.59	317 - 342 t2
IX	347 - 370 H	348 - 366 2.34	347 - 367 0.72	347 - 373 t2

- (1): Diese Arbeit. Zuordnung: H: stark hydrophob; h: hydrophob; a: amphipatisch; A: stark amphipatisch.
- (2): Kyte & Doolittle (1982). Die höchsten mittleren Hydrophobizitäten für Segmente von 19 Resten sind angegeben. °: Vorhergesagte Bereiche, die nicht den Anforderungen (Durchschnitt ± 1.6) entsprechen.
- (3): Vorhersage nach der Methode von Eisenberg et al. (1984). Die mittleren Hydrophobizitäten für Segmente von 21 Resten sind angegeben. Zuordnung: g: globulär; S: Oberfläche; t2: Transmembran (multimer).
- (4): Saraste (1984).

Die Anordnung der Helix IV außerhalb der Membran läßt sich aus Strukturvorhersagen nicht schlüssig ableiten. Die Vorhersage nach Kyte & Doolittle ergibt zwar einen zu niedrigen 19-Reste-Mittelwert, dies gilt jedoch ebenso für die (Häm-bindende) Helix II. Nach der Methode von Eisenberg et al. (1984), die mögliche amphipathische Helices berücksichtigt, wird Helix IV als Oberflächen-orientierte Helix vorhergesagt. Das gleiche gilt jedoch in dieser Vorhersage für die Helix I (die nach Kyte & Doolittle

Hydrophobic Moment Plot of CYTBb

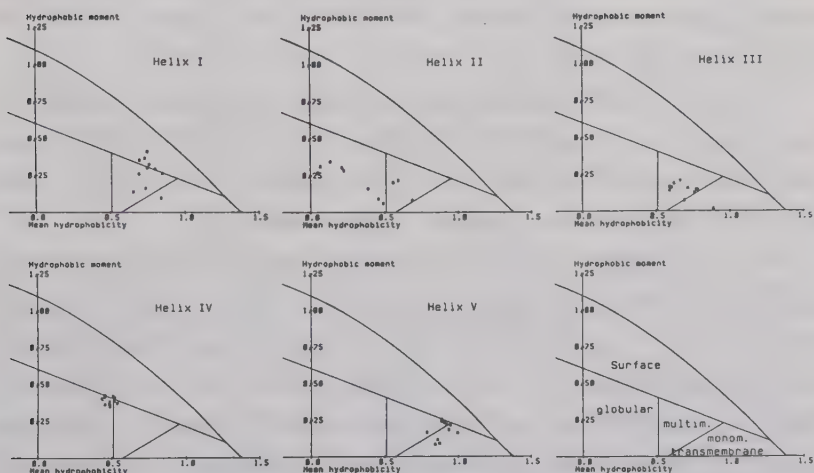


Abb. 9: "Hydrophobic moment plot" der Helices I - V des Cytochrom b aus Rinderherz.

Aufgetragen ist das "hydrophobic moment" (Ordinate) über der gemittelten Hydrophathie (Abszisse) für alle Segmente von 11 Resten der jeweiligen Helices. Das untere rechte Feld gibt die Zuordnung der Felder zu verschiedenen Arten von α -Helices nach Eisenberg et al. (1984) an: globulär, d.h., wasserlöslich; Surface, d.h. Oberflächen-orientiert; und transmembran.

eindeutig Membran-überspannend ist), die Häm-bindende Helix II wird sogar als "globulär", d.h. zu einem wasserlöslichen Protein(-anteil) gehörig, eingestuft. Eine genauere Analyse der "hydrophobic moment-plots" nach Eisenberg et al. zeigt, daß die Einordnung der Helices zum Teil sehr empfindlich auf geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz reagiert, da die Punkte, die sich in der zweidimensionalen Darstellung von gemittelter Hydrophobizität und "hydrophobic moment" ergeben, in der Nähe der Grenzlinien der einzelnen Bereiche liegen (Abb. 9).

Im "sided"-Hydropathie-Plot ist der amphipathische Charakter der fraglichen Helix IV deutlich erkennbar, ebenso der amphipathische Charakter wenigstens eines Teils der Helix II, der die Zuordnung dieser Helix nach Eisenberg erklärt (Abb. 10).

Da die Hydrophobizitätsanalysen keine eindeutige Aussage erlauben, sollen im Folgenden noch zwei andere Ansätze kurz diskutiert werden, die Hinweise auf die Anordnung der Helices innerhalb oder außerhalb der Membran geben können.

Der eine basiert auf der Vermutung, daß die Membran-ständigen Teile der Sequenz stärker konserviert seien als die wasserlöslichen Teile, da erstere die (stark konservierte) Umgebung der Häm-Zentren bilden. Die Analyse zeigt jedoch, daß die ersten fünf Helices einschließlich der fraglichen Helix IV etwa in gleichem Maße konserviert sind, unabhängig davon, welche Spezies betrachtet werden (Abb. 11). Die vier Helices VI bis IX sind wesentlich schwächer konserviert, und zwar sowohl innerhalb der mitochondrialen und bakteriellen Cytochrom b-Moleküle (bei denen diese vier Helices Teil des Cytochrom b sind), als auch im Vergleich dieser mit dem Cytochrom b_6 (bei dem die letzten vier Helices ein eigenes Polypeptid bilden). Die Konservierung der Helix IV

Sided - Hydropathy - Profiles of CYTBb

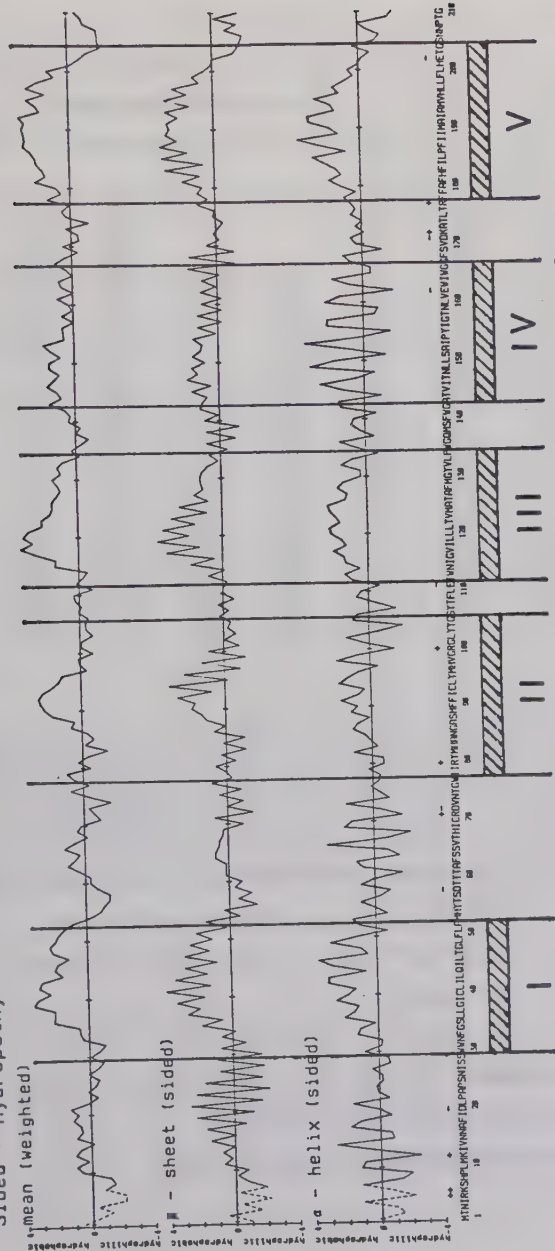


Abb. 10: "Sided"-Hydropathie-Plot der Helices I - V des Cytochrom b aus Rinderherz. Der amphipathische Charakter der Helix IV ist außer im "sided- α -helicalen"-Profil (unterste Spur) auch im "helical wheel"-Plot zu erkennen.

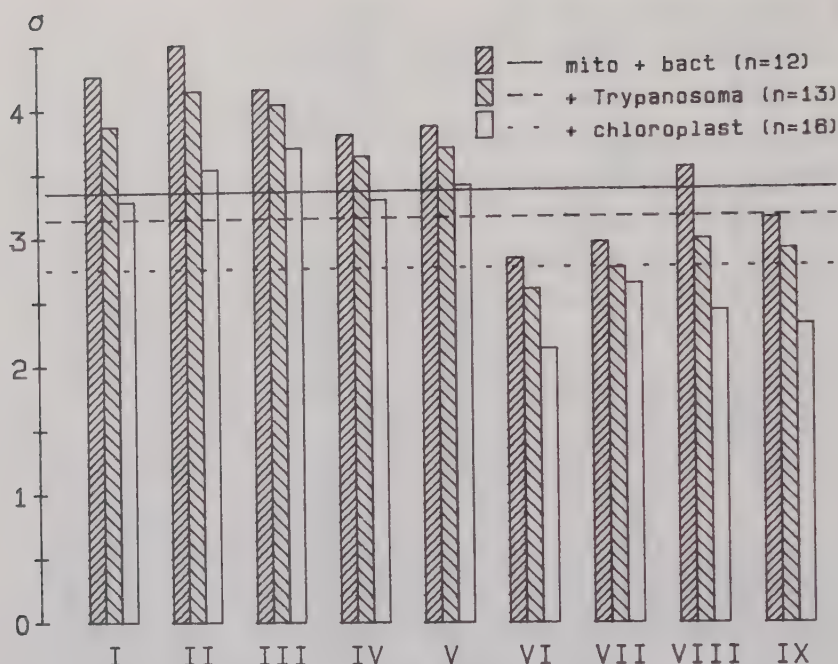


Abb. 11: Mittlere Ähnlichkeiten der 9 Helices des Cytochrom b. Für verschiedene Gruppen von Cytochrom b-Molekülen wurden die mittleren Ähnlichkeitskoeffizienten der 9 vorhergesagten Helices in Standardabweichungen aufgetragen. Die Linien bei $\sigma = 3.35$, 3.14 und 2.75 stellen die mittleren Ähnlichkeitskoeffizienten der gesamten Moleküle dar.

gestattet keine eindeutige Aussage, da die Erhaltung sowohl für eine Membran-überspannende Helix als auch für eine amphipathische Helix an der Membranoberfläche, die z.B. einen Teil eines Reaktionszentrums bilden könnte, wichtig wäre.

Der zweite Ansatz beruht auf einer Arbeit von von Heijne (1986), der gezeigt hat, daß in bakteriellen Membranproteinen eine stark asymmetrische Verteilung der positiven Reste innerhalb der wasserlöslichen Anteile der Proteine zwischen dem cytosolischen und dem periplasmatischen Raum vorliegt. Positiv geladene Aminosäureseitengruppen finden sich bevorzugt auf der negativ geladenen cytosolischen Seite der Membran, während die negativ geladenen Reste gleich verteilt sind; damit entspricht die Orientierung des Proteins dem Membranpotential, d.h., sie ist so, wie sich das Protein aufgrund des Membranpotentials orientieren würde, wenn es frei rotieren könnte.

Für zwei Bakterienarten (*Paracoccus denitrificans* und verschiedene *Rhodobacter*-Stämme) sind die Cytochrom b-Sequenzen bereits bekannt; daher ist es möglich, für diese Proteine die Ladungsprofile für ein 9- und ein 8-Helix-Modell vorherzusagen (Abb. 12). Für beide Bakterien ergeben sich fast identische Profile, die mit einem 8-Helix-Modell besser vereinbar erscheinen, da in diesem Modell neun der zehn wasserlöslichen Abschnitte die "richtige" Orientierung hätten (mit Ausnahme des stark negativen C-Terminus, der in jedem Modell "falsch" orientiert ist).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß aufgrund der Strukturvorhersagen eine eindeutige Entscheidung zwischen dem 8- und dem 9-Helix-Modell nicht möglich ist, obwohl einige theoretische Argumente und vor allem die konsistente Interpretation der Inhibitor-resistenten Punktmutanten für das 8-Helix-Modell sprechen.

Das Modell des "4- α -helicalen Bündels" bleibt unabhängig davon gültig; der Unterschied besteht darin, daß es sich entweder aus den Helices II, III, IV und V (9-Helix-Modell) oder aus den Helices

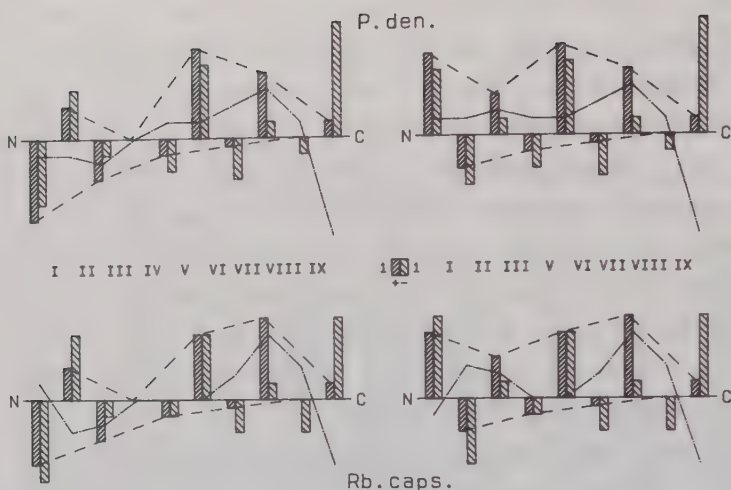


Abb. 12: Vergleich der Ladungsverteilungen des Cytochrom b aus *Paracoccus denitrificans* und *Rhodobacter capsulatus* entsprechend den 8- und 9-Helix-Modellen.

Die Anzahl der positiven (Arginin, Lysin) und negativen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) Aminosäuren in den "wasserlöslichen" Domänen zwischen den transmembranen Helices auf beiden Seiten der Membran wurden unter Annahme eines 8- bzw. 9-Helix-Modelles ermittelt. Alle Domänen auf einer Seite der Membran sind nach oben aufgetragen (Innenseite der Bakterien?), alle Domänen auf der anderen Seite der Membran nach unten. Die durchgezogene Linie stellt die Gesamtladung des Cytochrom b dar, die unterbrochenen Linien zeigen die Ungleichverteilung der positiven Ladungen auf beiden Seiten der Membran.

I, II, III und V (8-Helix-Modell) zusammensetzt. Im 9-Helix-Modell sind die beiden Häm-bindenden Helices II und V antiparallel, im 8-Helix-Modell sind sie jedoch parallel, wobei hier eine enge Wechselwirkung zwischen den parallelen Helices wegen der Wechselwir-

kung der parallelen Helix-Dipol-Momente energetisch weniger vorteilhaft ist. Während im 9-Helix-Modell eine "all-antiparallele" Anordnung der vier Helices wahrscheinlich ist (A in Abb. 13), würde dies im 8-Helix-Modell bedeuten, daß die Porphyrinringe im Zentrum des Bündels angeordnet sind (C in Abb. 13), obwohl dies wegen der Sperrigkeit der Porphyrinringe ungünstiger wäre; möglich erscheint daher auch Anordnung D, die nur partiell antiparallel ist. In jedem Fall resultiert im 8-Helix-Modell aus der parallelen Anordnung der Häm-bindenden Helices und aus der ungünstigeren Anordnung der vier Helices ein zusätzlicher Beitrag zum "steric strain" des Cytochrom b, also zu der im nativen Protein enthaltenen sterischen Spannung, die sich zum Beispiel in den g_z -Werten (ESR), in den Absorptionsmaxima und in den Redoxpotentialen widerspiegelt (Carter et al., 1981; Link et al., 1986).

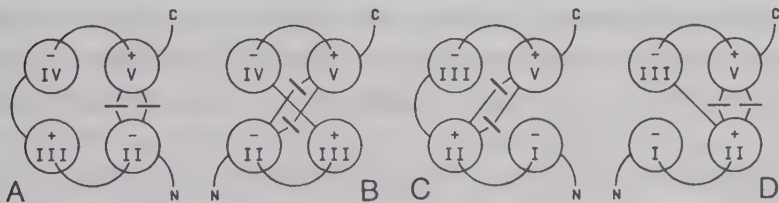


Abb. 13: Vier mögliche Anordnungen des 4- α -helicalen Bündels des Cytochrom b.

A und B: 9-Helix-Modell; A: vollständig antiparallel, die Hämzentren liegen am Rande des Bündels; B: partiell parallel, die Hämzentren liegen im Zentrum des Bündels.

C und D: 8-Helix-Modell; C: vollständig antiparallel, die Hämzentren liegen im Zentrum des Bündels; D: partiell parallel, die Hämzentren liegen am Rande des Bündels.

+ und - geben die Orientierung und das Dipolmoment der Helices an (N-Termini = +).

2.2.2.2 Cytochrom c_1

Cytochrom c_1 ist ein größtenteils hydrophiles Protein, das sich in den Intermembranraum der Mitochondrien bzw. in den periplasmatischen Raum der Bakterien erstreckt und in der Nähe des C-terminalen Endes einen hydrophoben Membrananker von ca. 20 Resten enthält. Die "Ähnlichkeitsmatrix" der bekannten Sequenzen zeigt eine ähnliche Phylogenie wie die des Cytochrom b (Abb. 14). Obwohl die spektralen Eigenschaften und die Redoxpotentiale von Cytochrom c und Cytochrom c_1 fast identisch sind, zeigen die Aminosäuresequenzen der beiden Proteinfamilien keine Homologie mit Ausnahme einer Sequenz Cys-x-x-Cys-His in der Nähe des N-Terminus. Diese liefert drei der vier Liganden des kovalent gebundenen Häms: die beiden Cysteine, die kovalent mit den Vinylgruppen des Häms reagieren, und ein Histidin als einen axialen Liganden (Abb. 15). Der zweite axiale Ligand im Cytochrom c ist ein Methionin; analog dazu ist ein Methionin in allen bekannten Cytochrom c_1 -Sequenzen konserviert (Met-160 in Rinderherz), das auch hier den zweiten axialen Liganden liefern dürfte (Link et al.,

	Ri	Ne	Sa	Pa	Rh
Rind		4.28	4.30	2.37	2.58
<i>Neurospora</i>	146		4.75	2.27	2.40
<i>Saccharomyces</i>	140	163		2.36	2.51
<i>Paracoccus</i>	71	81	84		4.11
<i>Rhodobacter</i>	76	80	86	141	

Abb. 14: Ähnlichkeitsmatrix des Cytochrom c_1 aus 5 verschiedenen Spezies.

Unteres linkes Dreieck: Anzahl identischer Aminosäuren nach Ausrichtung der Sequenzen; oberes rechtes Dreieck: Ähnlichkeit in Standardabweichungen (σ).

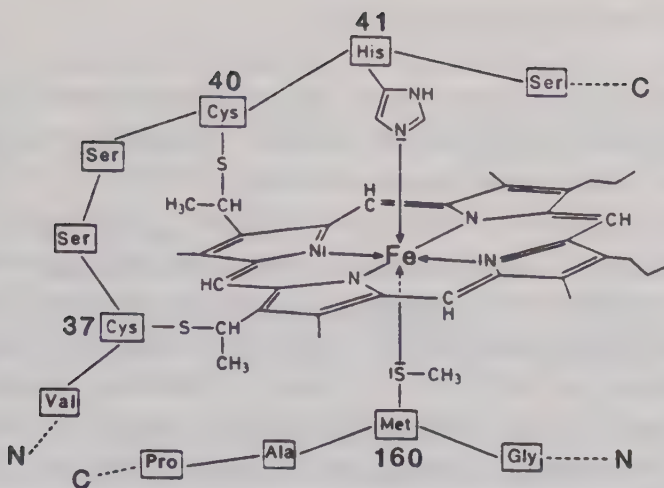


Abb. 15: Modell des Hämzentrums des Cytochrom c_1 .

1987). Es handelt sich jedoch nicht um das Methionin, das in der Originalpublikation der Sequenz als Ligand vorgeschlagen wurde (Met-208; Wakabayashi et al., 1980).

Der Bereich des Proteins, der auf der Innenseite der mitochondrialen bzw. bakteriellen Membran liegt (im Rinderherz-Cytochrom c_1 die letzten 20 Reste), enthält eine große Zahl von positiven Ladungen (9 Arginine und Lysine im Rinderherz-Cytochrom c_1) und folgt somit der "innen-positiv"-Regel von von Heijne (1986).

2.2.2.3 Eisen-Schwefel-Protein (ISP)

Die Sequenzen von sechs "Rieske"-Eisen-Schwefel-Proteinen wurden bisher proteinchemisch bestimmt (Rinderherz: Schägger et al., 1987; Spinat-Chloroplasten (teilweise): Pfefferkorn & Meyer, 1986), oder aus der DNA-Sequenz abgeleitet (*Neurospora crassa*: Harnisch et al., 1985; *Rhodobacter capsulatus*: Gabellini & Sebald, 1986; *Saccharomyces cerevisiae*: Beckmann et al., 1987; *Paracoccus denitrificans*: Kurowski & Ludwig, 1987; Spinat-Chloroplasten: Steppuhn et al., 1987); Abb. 16 zeigt die Ähnlichkeitsmatrix. Alle ISPs außer dem des Spinat- b_6f -Komplexes enthalten über 20% geladene Aminosäuren und haben einen Polaritäts-Index nach Vanderkooi & Capaldi (1972) von über 40% (Spinat: 15.6% geladene Reste, Polaritäts-Index 36%). Dies ist ein Indiz dafür, daß alle diese Proteine große hydrophile Domänen besitzen. Der Anteil an konservierten Resten beträgt nur 14% (32% ohne den Spinat); das C-terminale Drittel der Sequenz ist jedoch wesentlich stärker erhal-

	Ri	Ne	Sa	Pa	Rh	Sp
Rind		3.94	4.06	3.13	3.12	2.01
<i>Neurospora</i>	104		4.56	3.38	3.30	2.06
<i>Saccharomyces</i>	102	122		3.45	3.34	2.02
<i>Paracoccus</i>	83	84	83		4.53	1.92
<i>Rhodobacter</i>	80	85	83	134		1.93
Spinat (Chloroplast)	42	47	42	40	40	

Abb. 16: Ähnlichkeitsmatrix des "Rieske"-Eisen-Schwefel-Proteins aus 6 verschiedenen Spezies.

Unteres linkes Dreieck: Anzahl identischer Aminosäuren nach Ausrichtung der Sequenzen; oberes rechtes Dreieck: Ähnlichkeit in Standardabweichungen (σ).

Die Spinat-Sequenz ist die des Chloroplasten- b_6f -Komplexes.

```

:      :      *      *
Spinach:  ATSIDADNVDMQKRETLNLLLGALSLPTGYMLPYASFFVPPGGGAGTGGTIAKO  ALGND 67
Beef:     SHTDIKVPDFSDY  RRPEVLSTKSSKESSEA  RKGF SYLVATTATTGVVAYA AKNVVSQFVSSMSASAD
N. crassa: GSSSTFESPFKGESKAAKVPDFGKYMSKAPPSTNM  LF SYFMVGTMGAITAAG AKSTIQEFLKNMSASAD
S. carlsb.: KSTY  RTPNFDDVLKENNDADKG  RSYA YFMVGAMGLSSAG AKSTVETFISSMTATAD
P. denitr.: MSHADEHAGDHGATRR  DFL YYATAGAGTVAAGA A AWTLVNQMNPSAD
Rb. caps.: MSHAEDNAG  TRR  DFL YHATAATGVVVTGA A VWPLINQMNASAD
           +      :      *      *      *      *

* *      * * ;      - +
Spinach:  VIAA  EWLKTHAPGDRTLQGLGDPITYL  VVESDKTLATF GIN 130
Beef:     VLAMAKIEIKLSDIPEGKNMAFKWRGKPLFVRHRTKKEIDQEAAVEVSQLRDPQH  DLERVKKP  E
N. crassa: VLAMAKVEVDLNAIPEGKNVIIKWRGKPVFIRHRTPAEIEEANKVNVATLRDPET  DADRVKKP  E
S. carlsb.: VLAMAKVEVNLAAIPLGKNVVVKQGKPVFIRHRTPEIQEANSVMSALKDPQT  DADRVKKP  Q
P. denitr.: VQALASIQVDVSGVETGTLTKVWLKGPVFIRRTDEIQAGREVLDQLIRSAQNSKNPDAPATDENRTMDEA  GE
Rb. caps.: VKAMSSIFVDVSAVEVGTQLTKVWRGKPVFIRRDEKDIELARSVPLGALRDTSAENANKPGAEATDENRSLAADFQNTNGE
           * *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

*****      - : ***** *      *      +***** *
Spinach:  AVCTHLGCVVPFN AAE NKFCPCGSGSYNNQGRVVRGPAPLSALAHCD VDDGKVVFVPWTEDFRTGEAPWWSA 196
Beef:     WVILIGVCTHLGCVPIAN AGDFGGYPCPGSHYDASGRIRKGPAPLNLEVPVSYEFTSDGMVIG
N. crassa: WLVMLGVCTHLGCVPIGE AGDYGGWFCPCGSHYDISGRIRKGPAPLNLEIPLYEFPEEGKLVIG
S. carlsb.: WLIMLGICTHLGCVPIGE AGDFGGWFCPCGSHYDISGRIRKGPAPLNLEIPAYEF DGDQVIIVG
P. denitr.: WLVMLIGVCTHLGCVPIGDGAGDFGGWFCPCGSHYDTSGRIRRGAPQNLHIPVAEFLDDTTIKLG
Rb. caps.: Rb. caps.: WLVMLGVCTHLGCVPMGDKSGDFGGWFCPCGSHYDSAGRIRKGPAPRNLDIPVAEFLDDTTIKLG
           *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
           **      *      *      *      *      *      *      *      *      *
           **      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Abb. 17: Sequenzvergleich des Eisen-Schwefel-Proteins aus 6 Spezies.

Die unterste Reihe zeigt die Übereinstimmung zwischen den 5 mitochondrialen und bakteriellen Sequenzen, die oberste Reihe die Übereinstimmung zwischen allen 6 Sequenzen: * identische Reste; +,- erhaltene Ladungen (Austausch Arg - Lys bzw. Asp - Glu); : erhaltene aromatische Reste.

ten (35% in allen sechs Spezies, 55% ohne den Spinat) (Abb. 17). Obwohl die einzelnen Aminosäuren nicht sehr stark konserviert sind (zumindest auf die gesamte Sequenz bezogen), sind die Hydrophobizitätsmuster der Proteine gut erhalten (Abb. 18). Jedes Protein enthält einen langen hydrophoben Abschnitt in der Nähe

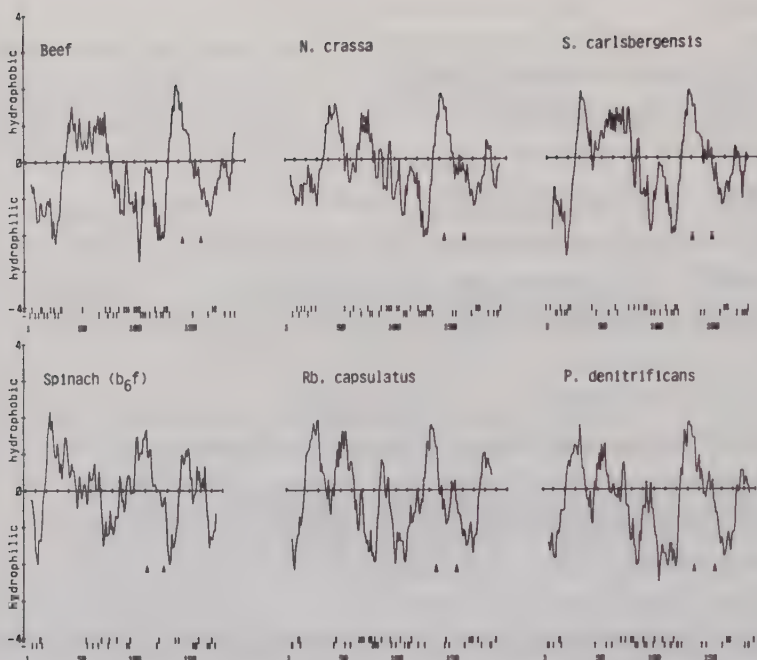


Abb. 18: Vergleich der Hydrophobizitätsmuster des Eisen-Schwefel-Proteins aus 6 Spezies.
Die Hydrophobizitätswerte sind jeweils über 11 Reste gemittelt.

des N-Terminus, während der Rest der Proteine hydrophil ist, mit Ausnahme einer kurzen hydrophoben Sequenz in einem stark konservierten Bereich in der Nähe des C-Terminus. Die Struktur kann daher in eine katalytische Domäne (C-terminal) und einen Membrananker (N-terminal) unterteilt werden.

Der hydrophobe Bereich in der Nähe des C-Terminus hat in allen ISPs (mit Ausnahme des ISP des b_6f -Komplexes) eine Länge

von ca. 40 Resten. Da diese Länge ausreichend für zwei Membran-überspannende α -Helices ist, könnte das Segment eine "Haarnadel"-Struktur bilden (Abb. 21). Eine derartige Struktur würde folgende Beobachtungen erklären:

- Der N-Terminus der mitochondrialen ISPs liegt auf der Außenseite der Membran, ebenso wie der Hauptteil des Proteins (W. Neupert, persönliche Mitteilung);
- Das Rinderherz-ISP kann ohne Störung des Restkomplexes durch Detergentien vom bc_1 -Komplex abdissoziiert werden (Engel et al., 1983a), da es im Gegensatz z.B. zu Cytochrom c_1 keine große Proteindomäne auf der Innenseite der Membran hat.

Interessant ist hier auch der Vergleich mit dem ISP des b_6f -Komplexes, da bei diesem der Membrananker nur aus einer Helix zu bestehen scheint. Im Mitochondrium lägen dann sowohl das Eisen-Schwefel-Zentrum als auch der N-Terminus auf der Außenseite (der inneren Membran), während im Chloroplasten zwar das Eisen-Schwefel-Zentrum innen, der N-Terminus aber ebenfalls außen läge; die N-Termini beider Proteine befänden sich also auf der Außenseite der entsprechenden Membranen. Dies könnte von Bedeutung für den Transport dieser kerncodierten Proteine an ihre Zielorte in der mitochondrialen bzw. plastidiären Membran und so mit dem vorgeschlagenen Mechanismus des "conservative sorting" (Hartl et al., 1986) zu vereinbaren sein.

Der stark konservierte Bereich am C-terminalen Ende des Proteins bindet das Eisen-Schwefel-Zentrum. Er enthält vier vollständig konservierte Cysteine, die als Liganden des Redoxzentrums vorgeschlagen wurden. Dies entspräche der Situation in den Ferre-

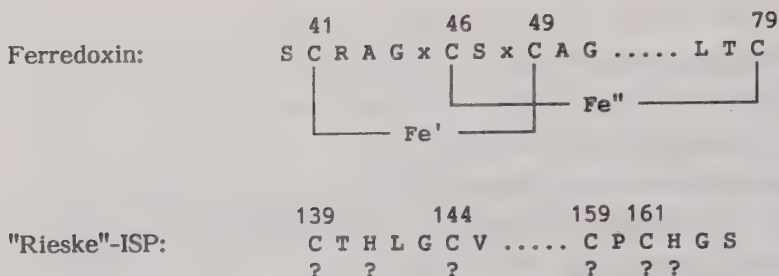


Abb. 19: Die Fe_2S_2 -Zentren-bindenden Sequenzen der pflanzlichen Ferredoxine und des "Rieske"-Eisen-Schwefel-Proteins.

Es sind nur vollständig konservierte Aminosäuren angegeben. Die Sequenzpositionen sind die von *Spirulina platensis* (nach Fukuyama et al., 1980) bzw. des Rinderherz-ISP (Schägger et al., 1987).

?: 4 dieser 6 Aminosäuren bilden die wahrscheinlichen Liganden (vgl. Abb. 21 und Text).

doxinen der Pflanzen, bei denen ebenfalls ein Fe_2S_2 -Cluster von vier Cystein-Resten gebunden wird. Es gibt jedoch keine Homologie zwischen der Bindungsstelle des Redoxzentrums im "Rieske"-ISP und in den Ferredoxinen (Abb. 19); in den Ferredoxinen sind drei Cysteine in der Sequenz eng benachbart und das vierte liegt weiter abwärts in der Sequenz, während beim "Rieske"-ISP die Cysteine in zwei Gruppen von je zwei eng benachbarten Cysteinen vorliegen. Auch unterscheiden sich die Redoxpotentiale der Ferredoxine und des "Rieske"-ISP um 700 mV ("Rieske"-ISP: +280 mV; Spinat-Ferredoxin: -420 mV), so daß die funktionelle Ähnlichkeit nicht gegeben ist, wie sie z.B. bei den ebenfalls nicht homologen, aber funktionell verwandten Cytochromen c und c_1 besteht.

Sided - Hydropathy - Profiles of ISPb

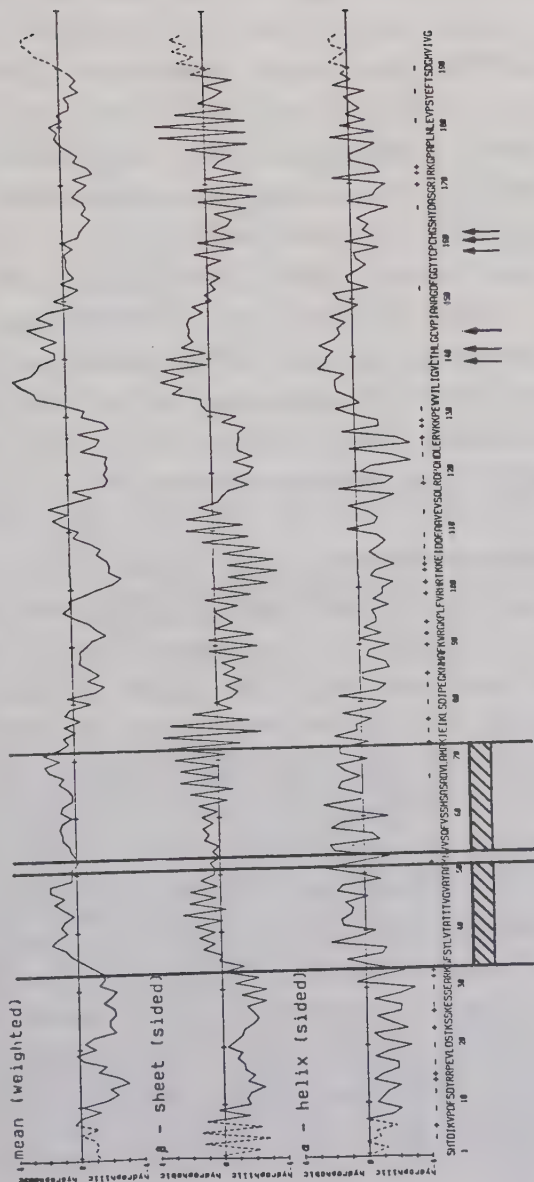


Abb. 20: "Sided"-Hydropathie-Plot des Eisen-Schwefel-Proteins aus Rinderherz.
Die Positionen der vorhergesagten Helices und der 6 möglichen Liganden des Fe_2S_2 -Zentrums sind eingezeichnet.

In der letzten Zeit wurde durch Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von J. Fee gezeigt, daß nicht die vier Cysteine die Liganden des Eisen-Schwefel-Zentrums bilden, sondern daß mindestens ein oder sogar zwei Nicht-Cystein-Reste beteiligt sind. Das "Rieske"-ISP aus *Thermus thermophilus* enthält zwei offensichtlich identische Fe_2S_2 -Cluster, deren spektrale Eigenschaften auch mit denen der mitochondrialen ISPs identisch sind, aber nur vier Cystein-Reste, so daß mehrere Nicht-Cystein-Liganden vorliegen müssen (Fee et al., 1984). ENDOR- und ESEEM-Messungen am bc_1 -Komplex aus Hefe haben ergeben, daß sich unter den Liganden des Eisen-Schwefel-Clusters mindestens ein und möglicherweise zwei Stickstoffatome befinden (Telser et al., 1987), davon ein Imidazol-Stickstoff einer Histidin-Seitenkette (Cline et al., 1985).

Der Vergleich der Sequenzen zeigt, daß außer den vier Cysteininen (Cys-139, Cys-144, Cys-158 und Cys-160 in Rinderherz) zwei Histidine (His-141 und His-161) und ein Arginin (Arg-170) vollständig konserviert sind, aber kein Lysin. Daher erscheint es wahrscheinlich, daß vier von diesen sieben Resten die Liganden des Eisen-Schwefel-Zentrums sind. Diese sieben Reste sind in zwei Domänen angeordnet, von denen eine dem kurzen hydrophoben Bereich entspricht, während die andere Domäne eine amphipathische Struktur zeigt (Abb. 20). Da sich das Eisen-Schwefel-Zentrum in der Nähe der Membranoberfläche befindet (T. Ohnishi, persönliche Mitteilung), liegt die Annahme folgender Struktur nahe: Das Eisen-Schwefel-Zentrum befindet sich zwischen zwei Proteindomänen, die jeweils zwei Liganden beisteuern. Eine dieser Domänen ist hydrophob und innerhalb der Membran gelegen, während die andere (amphipathische) Domäne über dem Redoxzentrum an der Membranoberfläche liegt.

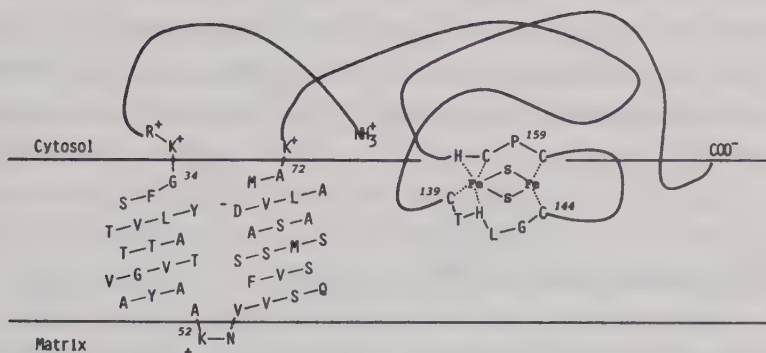


Abb. 21: Strukturmodell des Eisen-Schwefel-Proteins aus Rinderherz.

Da die genaue Koordinationsumgebung des Fe_2S_2 -Zentrums nicht bekannt ist, sind die 6 möglichen Liganden eingezeichnet (4 Cysteine und 2 Histidine; vgl. Text).

Das folgende Faltungsmuster faßt die bekannten Eigenschaften der mitochondrialen Eisen-Schwefel-Proteine schematisch zusammen (Schägger et al., 1987; Abb. 21):

- Die Amino- und Carboxy-Enden des Proteins liegen beide auf der Außenseite der inneren mitochondrialen Membran;
- der Hauptteil des Proteins ist hydrophil und erstreckt sich in den Intermembranraum;
- zwei amphipathische Helices im N-terminalen Teil des Proteins bilden einen Membrananker mit einer "Haarnadel"-Struktur;
- das Eisen-Schwefel-Zentrum ist in der Nähe des C-Terminus gebunden und befindet sich in der Nähe der Membranober-

fläche zwischen einer hydrophoben und einer amphipathischen Proteindomäne;

- die vier Liganden des Eisen-Schwefel-Zentrums sind zwei Cysteine, ein Histidin und eine noch nicht eindeutig identifizierte Seitenkette (wahrscheinlich noch ein Cystein oder Histidin).

2.2.2.4 Untereinheiten ohne Redoxzentren

Obwohl alle mitochondrialen bc_1 -Komplexe mehrere Untereinheiten ohne Redoxzentren enthalten, sind deren Sequenzen erst in zwei Fällen bekannt: Im bc_1 -Komplex aus Rinderherz wurden die Sequenzen der sechs kleinen Untereinheiten (6.4 - 13.4 kDa) bestimmt, die Sequenzen der zwei "Core"-Proteine (ca. 45 und 47 kDa) fehlen bisher, während im Hefe- bc_1 -Komplex die Sequenzen der beiden "Core"-Proteine und von vier der fünf kleinen Untereinheiten vorliegen. Anhang II gibt einen Vergleich der Eigenschaften dieser Proteine.

Sequenzvergleiche zeigen, daß nicht nur die Eigenschaften der korrespondierenden Untereinheiten aus Rind und Hefe (z.B. Ladung, Polarität) ähnlich sind, sondern daß die Proteine auch Sequenzhomologien zwischen 23 und 40% aufweisen (Anhang III). Die "normalen" und die "sided" Hydropathie-Muster sind in noch stärkerem Maße erhalten, was darauf hinweist, daß die homologen Proteine auch ähnliche Strukturen haben. Daher sollen die Strukturvorhersagen der verschiedenen Untereinheiten vergleichend für Rind und Hefe diskutiert werden.

"Core"-Proteine: Wie erwähnt, liegen diese Sequenzen bisher nur vom Hefe- bc_1 -Komplex vor; es handelt sich um große, über-

wiegend hydrophile Proteine. In dem der Hefe verwandten Pilz *Neurospora crassa* (roter Brotschimmel) sind diese beiden Proteine ohne Detergens löslich (Karlsson et al., 1983), nicht jedoch im Rinderherz. Die beiden Hefe-Untereinheiten enthalten dementsprechend keine langen (>20 Reste) hydrophoben Domänen, die als Membrananker dienen könnten; im "sided"-Hydropathie-Plot können jedoch einige amphipathische Bereiche identifiziert werden, die die Proteine an hydrophobe Teile des Komplexes binden könnten.

Untereinheit VI^(13.4) (Rind) = VII^(14.4) (Hefe): Diese Proteine enthalten keine stark hydrophoben Bereiche, jedoch zeigen große Teile beider Proteine im "sided"-Hydropathie-Muster eine mögliche amphipathische α -Helix-Struktur (Anhang IV). Drei dieser Bereiche befinden sich in den homologen Teilen der beiden Proteine; einer am N-Terminus, einer in der Mitte beider Proteine (ca. Position 50) und einer am C-Terminus. Beide Proteine scheinen eine stark amphipathische Gesamtstruktur zu haben und liegen daher möglicherweise zwischen hydrophoben und hydrophilen Bereichen der Komplexe in der Nähe der Membranoberfläche (Abb. 22).

Durch Photoaffinitätsmarkierung des Rinderherzkomplexes mit dem Ubichinonderivat 2,3-Dimethoxy-5-methyl-6-[10-[4-(azido-2-nitroanilinopropionoxy)]-decyl]-1,4-benzochinon (NAPA-Chinon) haben Yu & Yu (1982) spezifisch die Untereinheit VI^(13.4) markiert und diese daher als das "Chinon-bindende Protein" des Komplex III ("QP-C") bezeichnet. Diese "Chinon-bindenden Proteine" binden die Chinone jedoch nicht dauerhaft, sondern stellen Teile der Chinon- oder Semichinon-Bindungsstellen in den Atmungskettenkomplexen dar. Im bc₁-Komplex wird jeweils ein Teil der beiden Chinon-Reaktionsstellen vom Cytochrom b gebildet, auf das (oder von dem) die Elektronen des Chinons übertragen werden. Da das Cyto-

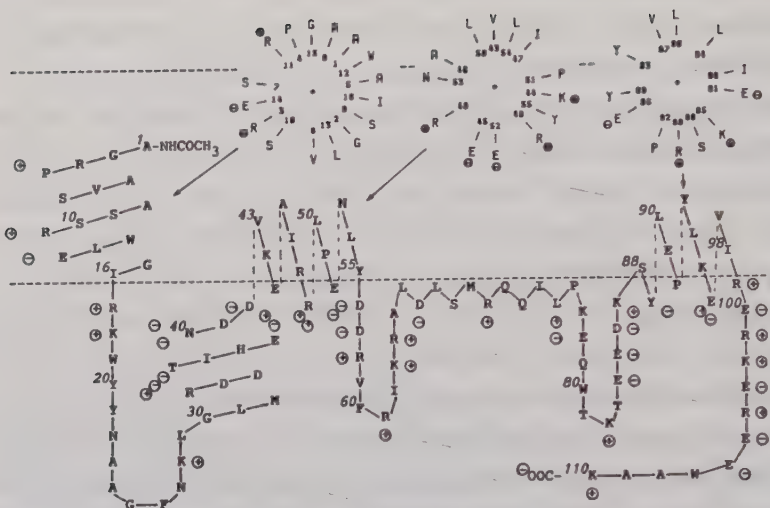


Abb. 22: Vorhergesagtes Faltungsmuster der Untereinheit VI^(13.4) (Rinderherz).
Die "helical wheels" der drei amphipathischen Helices sind dargestellt.

chrom b vor allem die Teile der Reaktionszentren liefert, die innerhalb der Membran liegen, könnte das amphipathische "Chinon-bindende Protein" von der Oberfläche der Membran her den "Dekkel" eines der beiden Reaktionszentren, möglicherweise des Q_i-Zentrums, bilden. Für diese Lokalisation spricht die Beobachtung von Japa et al. (1987), daß das "QP-C" in Hefe spezifische Antikörper auf der Innenseite der Membran bindet; dem steht jedoch entgegen, daß die Bindung der Antikörper zu einer partiellen Hemmung des Q_o-Zentrums führte.

zwei benachbarte Prolin-Reste enthält. Die entsprechende Sequenz ist bei der Hefe nicht konserviert, und es gibt dort auch keinen längeren ungeladenen Bereich der Sequenz. Die Untereinheit VII^(9.5) aus Rinderherz scheint bei der Spaltung des Komplexes mit den (größtenteils wasserlöslichen) "Core"-Proteinen assoziiert zu sein (Schägger et al., 1986).

Untereinheit VIII^(9.2) (Rind) = VI^(14.5) (Hefe): Beide Proteine enthalten einen großen Überschuß an sauren Aminosäuren, der sich hauptsächlich in einem Bereich am N-Terminus befindet. Bei der Hefe-Untereinheit ist dieser Sequenzbereich stark verlängert und enthält unter anderem eine fortlaufende Sequenz von 25 negativ geladenen Aminosäuren (Rinderherz: 8 Glutaminsäuren). Der Rest der Sequenz ist stark homolog und enthält in beiden Proteinen je zwei mögliche amphipathische α -Helices. Die Rinderherz-Untereinheit enthält fünf Cysteine, die zwei intramolekulare Disulfidbrücken bilden (Mukai et al., 1985). Eine dieser Disulfidbrücken wird von zwei Cysteinen gebildet, die etwa in der Mitte der beiden amphipathischen α -Helices liegen und in der Hefe-Untereinheit nicht erhalten sind; diese Disulfidgruppe würde in der Rinderherz-Untereinheit die beiden amphipathischen α -Helices miteinander verbinden. Die zweite Disulfidbrücke im Rinderherzprotein wird von zwei Cysteinen gebildet, die beide in der Hefe-Untereinheit konserviert sind. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die Hefe-Untereinheit ebenfalls eine (von diesen beiden Cysteinen gebildete) Disulfidbrücke enthält. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz dafür, daß bei der Konservierung der Aminosäuresequenz vor allem strukturelle Elemente erhalten sind.

Im Rinderherzkomplex hängt die Untereinheit VIII^(9.2) fest mit dem Cytochrom c₁ und der Untereinheit X^(7.2) zusammen; diese

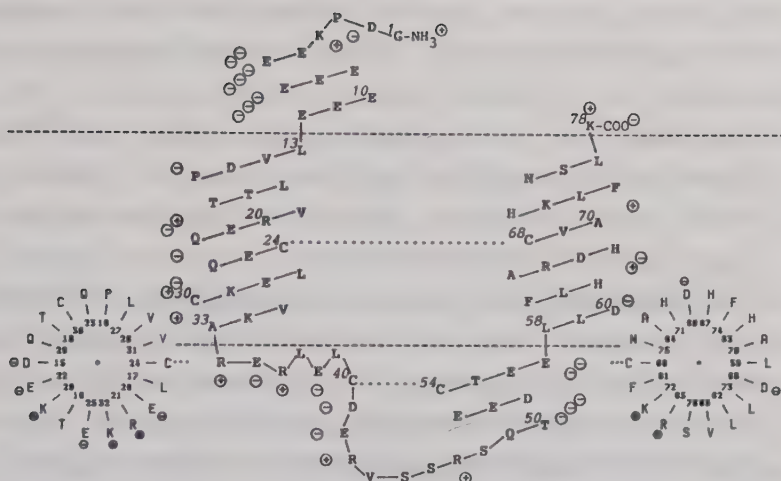


Abb. 24: Vorhergesagtes Faltungsmuster der Untereinheit VIII^(9.2) (Rinderherz).

Die zwei Disulfidbrücken (Mukai et al., 1985) sowie "helical wheels" der beiden, durch eine der Disulfidbrücken verbundenen, Helices sind dargestellt.

drei Untereinheiten bilden den sogenannten c_1 -Subkomplex. Da ursprünglich angenommen wurde, daß die saure Untereinheit den Kontakt zwischen Cytochrom c_1 und dem basischen Cytochrom c bewirke, wurde sie "hinge" (Gelenk-) Protein genannt (Wakabayashi et al., 1982).

Da die Untereinheit durch den stark sauren Bereich am N-Terminus insgesamt stark negativ geladen ist, ergibt sich eine Analogie zu dem Calcium-bindenden Protein Calmodulin. Kürzlich haben Schmitt & Trumpower (1987) eine Homologie der Hefe-Untereinheit zu Hefe-Calmodulin beschrieben, die sich auf eine der

Calcium-Bindungsstellen erstrecken soll. Eine genauere Analyse zeigt jedoch, daß der fragliche Bereich der Hefe-Untereinheit VI^(14.5) wahrscheinlich keine funktionelle Calcium-Bindungsstelle darstellt:

- Der Bereich ist in der Rinderherz-Untereinheit VIII^(9.2) nicht konserviert; daher müßten die Untereinheit VI^(14.5) (Hefe) und VIII^(9.2) (Rinderherz) trotz ihrer hohen Sequenzhomologie eine unterschiedliche Funktion aufweisen.
- Der Sequenzvergleich zwischen der Untereinheit VI^(14.5) (Hefe) und Calmodulin zeigt, daß die Hälfte der "typischen" Reste der Calcium-Bindungsstellen nicht erhalten ist. Zu den nicht konservierten Resten zählen die beiden hydrophoben Reste an beiden Enden der Bindungsstelle sowie zwei der Liganden des

		X	Y	Z	-Y	-X	-Z
Calmodulin	20- 32:	F D	D N	N G	S I	S S	S E L
	56- 69:	I D V	D G N	H Q	I E	F S	E F
	93-106:	F D K	N G D	G L	I S	A A	E L
	129-141:	V S	D G	S G	E I	N I	Q Q F
VI ^(14.5) , Hefe	63- 75:	T E	E G	K A	L V	H H	Y E E
			*				*
VIII ^(9.2) , Rind	27- 39:	L E	K C	V K	A R	E R	L E L

Abb. 25: Vergleich der Sequenzen der vier Calcium-bindenden "EF-Hände" des Calmodulins aus Hefe (Davis et al., 1986) mit der vorgeschlagenen Calcium-Bindungsstelle der Untereinheit VI^(14.5) des Hefe-bc₁-Komplexes (Schmitt & Trumpower, 1987), sowie der entsprechenden Sequenz der Untereinheit VIII^(9.2) aus Rinderherz. Die jeweils sechs Liganden, die die oktaedrische Umgebung des gebundenen Calciums bilden (Tufty & Kretsinger, 1975), sind angezeigt.

* Identische Reste der beiden bc₁-Untereinheiten.

Calciums (Austausch Serin gegen Histidin und Asparaginsäure gegen Lysin; Abb. 25). Die Tatsache, daß zwei Calcium-Liganden nicht konserviert sind, ist von besonderer Bedeutung, da zwei Aminosäuren, die mit negativ geladenen Sauerstoffatomen (Hydroxyl- bzw. Carboxylatgruppen) zur Komplexierung des positiven Calciumions beitragen, gegen Aminosäuren ausgetauscht sind, die eine positive Ladung tragen und daher die Bindung eines positiven Ions verhindern.

- Ein weiteres Indiz für das Fehlen einer Verwandtschaft zum Calmodulin sind die Strukturvorhersagen für wasserlösliche Proteine. Im Calmodulin wird die Struktur offensichtlich nicht durch Wechselwirkungen verschiedener Sekundärstrukturbereiche bestimmt, sondern die einzelnen Bindungsstellen falten sich unabhängig und behalten ihre freien Valenzen für die Bindung des Calciums; daher ergeben die Strukturvorhersagen, z.B. nach Chou & Fasman (1978) oder Garnier et al. (1978), gute Ergebnisse, und das Helix-Loop-Helix-Motiv der Calcium-Bindungsstelle ist in jedem Fall zu erkennen. Der entsprechende Bereich der Untereinheit VI^(14.5) der Hefe wird jedoch als durchgehend α -helical vorhergesagt, d.h. die Sequenzunterschiede sind so groß, daß die Strukturvorhersagen eine völlig unterschiedliche Struktur ergeben.

Untereinheit IX^(8.0) (Rind): Diese Untereinheit wurde bisher nur vom Rinderherzkomplex sequenziert, von der möglichen homologen Untereinheit dazu aus der Hefe ist bisher nur das Molekulargewicht von ca. 8.5 kDa bekannt. Die Untereinheit hat die geringste Polarität der kleinen Untereinheiten, obwohl sie keinen sehr stark hydrophoben Bereich besitzt; sie enthält aber

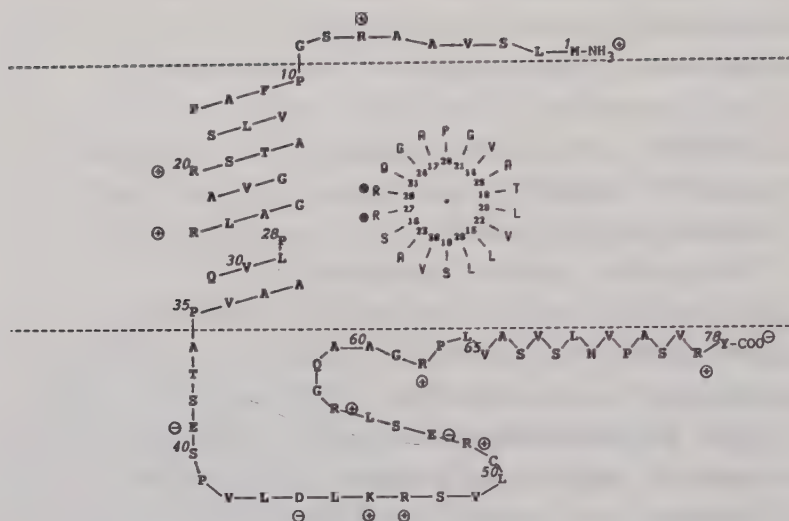


Abb. 26: Vorhergesagtes Faltungsmuster der Untereinheit IX^(8.0) (Rinderherz).
Das "helical wheel" der transmembranen Helix ist dargestellt.

eine stark amphipathische α -Helix mit zwei Argininen direkt übereinander auf der Helixoberfläche. Eine Besonderheit ist eine mögliche amphipathische β -Faltblatt-Struktur in der Nähe des C-Terminus.

Untereinheit X^(7.2) (Rind) = IX/X^(7.3) (Hefe): Diese Untereinheit ist im Rinderherzkomplex die kleinste Komponente des c_1 -Subkomplexes. In beiden Proteinen ist ein hydrophober Membrananker deutlich zu erkennen, der teilweise eine amphipathische Struktur mit einer negativen Überschußladung von -2 bzw. -1 be-

Die Asymmetrie der Ladungsverteilung der beiden kleinen Untereinheiten $X^{(7.2)}$ und $XI^{(6.4)}$ legt die Vermutung nahe, daß die Verteilung mit dem Membranpotential korrespondiert, wie dies von von Heijne (1986) für bakterielle Membranproteine gezeigt wurde. Die Verteilung entspricht jedoch insofern nicht der "innen-positiv"-Regel von von Heijne, als die Ladungsdifferenzen aus der unterschiedlichen Verteilung der negativen Reste zwischen den Bereichen auf beiden Seiten der Membran resultieren und die positiven Reste etwa gleich verteilt sind, während die "innen-positiv"-Regel sich auf die Verteilung der basischen Reste (Arginin und Lysin) bezieht.

2.2.2.5 Strukturprinzipien

Die dreidimensionale Grobstruktur des mitochondrialen bc_1 -Komplexes aus *Neurospora crassa* wurde von Leonard et al. (1981) aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von zweidimensionalen Kristallen abgeleitet. Die Bilder zeigen Dimere mit einer C_{2h} -Achse senkrecht zur Membran; das gesamte Gebilde hat näherungsweise Schmetterlingsform (Abb. 29). Etwa 20% der Proteinmasse befinden sich auf der Außenseite der Membran, 50% ragen in die mitochondriale Matrix und 30% sind innerhalb der Membran. Dies entspricht bei einer Größe eines Monomers von ca. 2100 Aminosäuren ca. 400 Aminosäuren auf der Außenseite, 1100 Aminosäuren auf der Innenseite und 600 Aminosäuren innerhalb der Membran, d.h. einer Anordnung von mindestens 25 α -Helices mit einer Länge von 20 Resten in der Lipidphase. Diese Abschätzung zeigt, daß die Untereinheiten ohne Redoxzentren einen we-

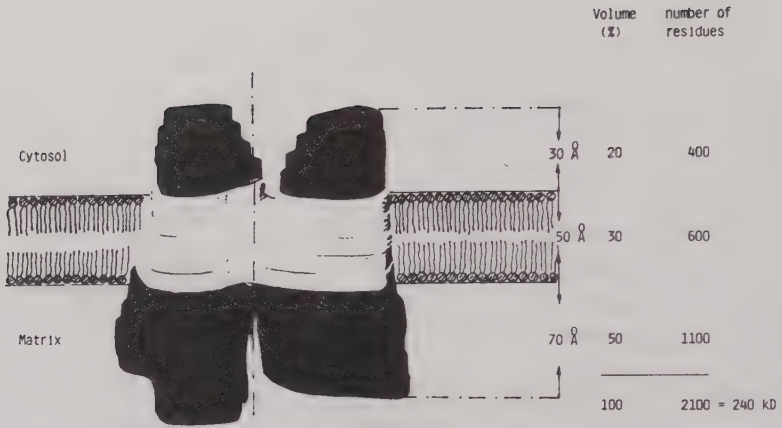


Abb. 29: Niedrig-aufgelöste 3D-Struktur des bc_1 -Komplexes aus *Neurospora crassa* nach Leonard et al. (1981).

sentlichen Beitrag zum Membranteil des bc_1 -Komplexes liefern müssen, da die drei katalytischen Untereinheiten (mit Redoxzentren) nur 11 bis 12 Helices beitragen, entsprechend 280 Resten oder 13% der Gesamtmasse (ca. 50% des Membrananteils). Unsere Strukturvorhersagen stimmen mit diesem Bild gut überein.

Auf der Außenseite der Membran liegen hauptsächlich Cytochrom c_1 (200 Aminosäuren) und das Eisen-Schwefel-Protein (150 Aminosäuren); den Hauptteil der Proteinmasse auf der Innenseite der Membran bilden die "Core"-Proteine (ca. 800 Aminosäuren; Karlsson et al., 1983).

Die vorhergesagten amphipathischen Helices der kleinen Untereinheiten enthalten eine Anzahl von geladenen oder ionisierbaren Seitengruppen. Die Existenz geladener Reste innerhalb transmem-

braner Segmente kann nur dann angenommen werden, wenn man davon ausgeht, daß ihre Ladungen durch Ionenpaarbildung mit anderen (entgegengesetzt) geladenen Resten kompensiert werden, da das Vorkommen von freien Ladungen in Bereichen niedriger Dielektrizitätskonstante energetisch ungünstig ist. Ionenpaare dieser Art wurden z.B. beim Bacteriorhodopsin beschrieben; sie sind dort an der Ausbildung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Helices beteiligt (Engelman & Zaccai, 1980).

Allgemein tragen sehr verschiedene Arten von Wechselwirkungen zur Stabilisierung der dreidimensionalen Anordnung der membrangebundenen Multiproteinkomplexe bei: (i) hydrophobe Wechselwirkungen; (ii) Van-der-Waals-Wechselwirkungen; (iii) Wasserstoffbrückenbindungen; (iv) ionische Wechselwirkungen; und (v) kovalente Wechselwirkungen, z.B. Disulfidgruppen.

"Hydrophobe Wechselwirkungen" ist eine Bezeichnung für den Entropiegewinn bei der Zusammenlagerung von hydrophoben Molekülen und der Freisetzung von Wassermolekülen. Diese Kräfte tragen zur Stabilisierung eines Membrankomplexes relativ wenig bei, da sie unspezifisch sind, d.h. nur eine Wechselwirkung mit anderen hydrophoben Molekülen, also auch z.B. mit Lipidseitenketten, bewirken. Zu den Van-der-Waals-Wechselwirkungen gehören z.B. Helix-Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wechselwirkungen von permanenten Dipolen mit induzierten Dipolen und Wechselwirkungen zwischen leicht polarisierbaren Resten, z.B. aromatischen Aminosäureseitengruppen. Diese Kräfte können sowohl in wasserlöslichen als auch in hydrophoben Proteinen einen Beitrag zur Proteinstabilisierung liefern, wie es für den Fall des "4- α -helicalen Bündels" diskutiert wurde; auch das "stacking" von aromatischen Resten ist ein Beispiel hierfür. Wasserstoffbrückenbindungen tragen ebenfalls in allen Proteinen zur Stabilisierung der Struktur bei.

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidgruppen sind ein wesentlicher Grund für die Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturen, während Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Seitengruppen spezifische und gerichtete Wechselwirkungen vermitteln können, aber vom Vorhandensein bestimmter Seitengruppen abhängig sind. Ionische Wechselwirkungen haben in wasserlöslichen Proteinen eine ähnliche Stärke wie Wasserstoffbrückenbindungen und sind vom Vorhandensein geladener Seitengruppen abhängig; ihre Bindungsenergie kann jedoch in hydrophoben Proteinen wesentlich größere Werte annehmen, da die Stärke nach

$$\delta E = e_1 e_2 / \epsilon d$$

(e_1, e_2 : Ladungen; ϵ : effektive Dielektrizitätskonstante; d : Abstand) in hydrophober Umgebung ($\epsilon_{\text{membr}} \approx 4$) gegenüber Wasser ($\epsilon = 78.5$) zunimmt. Kovalente Bindungen zwischen Aminosäure-seitengruppen scheinen in den Atmungskettenkomplexen selten zu sein; Disulfidgruppen wurden bisher erst für die Untereinheit VIII^(9,2) des Rinderherz-bc₁-Komplexes nachgewiesen.

Starke und spezifische Bindungen zwischen hydrophoben Bereichen können somit nur durch Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen vermittelt werden, also durch Wechselwirkungen, die vom Vorhandensein polarer Seitengruppen abhängen (Engelman, 1982). Das Vorkommen von polaren Seitengruppen in den amphipathischen Bereichen der Multiproteinkomplexe der Atmungskette, wie auch in anderen Membranproteinen, kann daher als eine wesentliche Voraussetzung für die Stabilität ihrer dreidimensionalen Struktur angesehen werden.

3. Experimenteller Teil

Ziel der experimentellen Arbeiten war es, die Strukturvorhersagen am Beispiel des Rinderherz-bc₁-Komplexes zu überprüfen und Aussagen über die Struktur des Rinderherzkomplexes und seiner einzelnen Untereinheiten zu erhalten. Eine Auswertung der in der Literatur beschriebenen Arbeiten über die Struktur des bc₁-Komplexes ist nur begrenzt möglich, da die Zusammensetzung des Rinderherz-bc₁-Komplexes und die Zahl der kleinen Untereinheiten erst in letzter Zeit aufgeklärt wurden (Schägger et al., 1986). Lediglich für die beiden "Core"-Proteine ist gesichert, daß sie sich überwiegend im mitochondrialen Matrixraum befinden (Mendel-Hartvig & Nelson, 1978, 1983; Karlsson et al., 1983).

Folgende experimentelle Ansätze wurden angewandt:

1. **Immunologische Experimente.** Es wurden polyklonale Antikörper gegen den Gesamtkomplex sowie gegen die einzelnen Untereinheiten hergestellt und mit ihrer Hilfe die Zusammensetzung des bc₁-Komplexes in verschiedenen Organismen sowie die Topologie der Untereinheiten untersucht.
2. **Dissoziationsexperimente.** Es wurde versucht, durch Dissoziation des bc₁-Komplexes unter verschiedenen Bedingungen die relative Anordnung der Untereinheiten und das Vorliegen von Subkomplexen sowie die hydrophoben Eigenschaften bzw. die Wasserlöslichkeit der einzelnen Untereinheiten festzustellen.
3. **Proteolytischer Verdau.** Die Topologie der Untereinheiten sollte durch limitierte Proteolyse mit verschiedenen Proteasen getestet werden.

3.1 Material und allgemeine Methoden

3.1.1 Material

Cytochrom c (Pferdeherz) und Tris {2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol}: Boehringer, Mannheim; Rinderserumalbumin: Behringwerke AG, Marburg; Coomassie Blau G-250, Tricin {N-[2-hydroxy,1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl-glycin] und Triton X-100 (for scintillation techniques, analytical grade): Serva, Heidelberg; Cholsäure und Desoxycholsäure: Merck, Darmstadt; Sucrose: Pfeifer & Langen, Köln.

Alle anderen Chemikalien waren von der höchsten erhältlichen Reinheit und wurden überwiegend von den Firmen Merck, Darmstadt, und Fluka, Buchs (Schweiz), bezogen.

3.1.2 Präparative Methoden

Rinderherz-Mitochondrien wurden nach Smith (1967) isoliert. Mitochondrien aus verschiedenen Rattengeweben oder anderen Tieren wurden wie folgt isoliert:

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die aus zwei Ratten von je ca. 250 g Gewicht gewinnbaren Organe. Die Organe wurden gewaschen, feinst geschnitten, in ca. 100 ml Puffer (250 mM Sucrose, 20 mM Triethanolamin, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF {Phenylmethylsulfonylfluorid}, pH 7.2) aufgenommen und bis zur Homogenität gepottert. Nach der Zugabe von weiteren 100 ml Puffer wurde 10' bei 580 g zentrifugiert (1750 Upm im Rotor GS3

oder 2200 Upm im Rotor SS34), das Pellet verworfen und der Überstand 20' hochtourig zentrifugiert (9000 Upm im Rotor GS3 = 14 500 g oder 13 000 Upm im Rotor SS34 = 20 000 g). Das Pellet wurde in ca. 30 ml Puffer aufgenommen, gepottert und erneut abzentrifugiert (20', 15 000 Upm im Rotor SS34). Die so gereinigten Mitochondrien wurden in 5-10 ml Puffer aufgenommen, nochmals gepottert, portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der bc_1 -Komplex wurde nach Engel et al. (1983b) und Schagger et al. (1986) isoliert. Er wurde in 0.05% Triton X-100, 0.1 M NaCl, 20 mM Mops, 2 mM NaN_3 , pH 7.2, erhalten und nach Zugabe von 55% (w/v) Glycerin bei $-20^\circ C$ aufbewahrt. Die Isolierung der einzelnen Untereinheiten erfolgte nach Schagger et al. (1986).

2,3-Dimethoxy-6-methyl-5-nonyl-1,4-benzochinon (Nonyl-ubichinon, NBQ) wurde in einer Eintopfsynthese synthetisiert: Zuerst wurde aus Caprinsäurechlorid und Wasserstoffperoxid in Chloroform unter Zugabe von NaOH Caprinsäureperoxid dargestellt und dieses in Eisessig bei 95° mit 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon (Q_0 , Fluka) umgesetzt. Die Reduktion zum Hydrochinon (NBH) erfolgte in Hexan/Wasser mit Dithionit. Das reduzierte Hydrochinon wurde in Dimethylsulfoxid unter Stickstoff aufgenommen, portioniert und bei $-20^\circ C$ aufbewahrt.

Hühnerei-Phospholipid wurde nach der von Krämer & Klingenberg (1980) verbesserten Methode von Wells & Hanahan (1969) isoliert. Das Präparat wurde zur Nachreinigung aus Ether/Aceton umgefällt und unter Stickstoff bei $-20^\circ C$ aufbewahrt. Die Präparation von Proteoliposomen erfolgte mittels der Cholat-Dialysemethode von Kagawa & Racker (1971) in der modifizierten Vorschrift von Brandt et al. (1988): 260 mg Phospholipid wurden in ein Beschallungsgefäß eingewogen, 1.2 ml Kaliumcholat-Stamm-

lösung (500 mM Kaliumcholat, 2 mM NaN_3 , pH 7-8) sowie 6 ml Puffer (100 mM NaCl, 20 mM Mops, 2 mM NaN_3 , pH 7.2) zugefügt und im Eisbad intermittierend beschallt, bis das Phospholipid gelöst war (ca. 10'). Nach Kontrolle und Korrektur des pH-Wertes wurden 35 nMol des bc_1 -Komplexes in 50% Glycerin zugesetzt, gemischt und dreimal gegen das 100-fache Puffervolumen dialysiert (Pufferwechsel nach 2, 4 und 16^h).

3.1.3 Analytische Methoden

Polyacrylamidgele wurden mit dem Tricine-System nach Schägger & von Jagow (1987) durchgeführt.

Die Proteinbestimmung von Mitochondrien erfolgte nach der modifizierten Biuretmethode nach Bode et al. (1968) mit einem Extinktionskoeffizienten von $11.0 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 568 nm. Die Proteinbestimmung von isolierten Proteinen oder Untereinheiten erfolgte nach der Lowry-Methode in der Modifikation von Helenius & Simons (1972) oder der BCA-Methode (Pierce Chemical Company, Mikro-Arbeitsvorschrift). Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die Lowry-Methode und die BCA-Methode ergaben identische Ergebnisse.

Cytochromgehalte wurden aus Differenzspektren (Dithionit-reduzierte minus Ferricyanid-oxidierte Probe) unter Verwendung folgender Extinktionskoeffizienten ermittelt:

Cytochrom c bzw. c_1 : $\epsilon_{549.5-540} = 19.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

Cytochrom b: $\epsilon_{562-575} = 28.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$;

Cytochrom aa_3 : $\epsilon_{605-650} = 24.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.1.4 Enzymatische Tests

Aktivitätstestpuffer: 250 mM Sucrose, 50 mM Kaliumphosphat, 2 mM KCN, 0.2 mM EDTA, 0.1% Rinderserumalbumin, pH 7.2.

Die Ubihydrochinon:Cytochrom c-Reduktase-Aktivität des bc_1 -Komplexes wurde über die Cytochrom c-Reduktion in einem Zweiwellenlängenphotometer (Shimadzu UV 300) bei 549.5 nm gegen 540 nm als Referenzwellenlänge gemessen; der Extinktionskoeffizient des Cytochrom c bei diesem Wellenlängenpaar wurde als $19.0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angenommen.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. 50 μM Cytochrom c wurden im Testpuffer vorgelegt. Danach wurden zuerst das Ubihydrochinon (2-5 μl einer 10-20 mM Lösung in Dimethylsulfoxid) zugegeben, die Blindrate bestimmt und die Reaktion dann mit dem Enzym gestartet.

3.2 Immunologische Experimente

Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen den gesamten Rinderherz-bc₁-Komplex und gegen Unterkomplexe oder daraus isolierte Untereinheiten sollte versucht werden, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Zusammensetzung der bc₁-Komplexe aus verschiedenen Organismen, insbesondere das Vorkommen von kleinen Untereinheiten;
- Vorliegen von Isoenzymen (besonders der kleinen Untereinheiten) in verschiedenen Geweben oder verschiedenen Entwicklungsstufen eines Organismus;
- Topologie der einzelnen Untereinheiten des Rinderherz-bc₁-Komplexes; dazu wurde der Komplex mit verschiedenen IgG-Fraktionen immunopräzipitiert und die IgG durch Western-Blotting nachgewiesen.

3.2.1 Methoden

3.2.1.1 Gewinnung von IgG

Zur Gewinnung von Antiseren wurden junge adulte Kaninchen dreimal im Abstand von je 14 Tagen mit je 100-200 µg des jeweiligen Antigens immunisiert. Dazu wurde das Antigen mit Aqua ad injectabilia auf 1 ml verdünnt, mit 1 ml Adjuvans (1. Immunisierung: komplettes Freundsches Adjuvans (Sigma); 2. und 3. Immunisierung: inkomplettes Freundsches Adjuvans (Sigma)) versetzt,

gut homogenisiert und unter Fraktionierung der Gesamtmenge an mehreren Stellen dorsal subkutan injiziert. Zehn Tage nach der dritten Immunisierung wurde den Kaninchen aus der Ohrrendvene Blut entnommen und daraus das Serum gewonnen. Nach 14 Tagen wurde das Antigen ein weiteres Mal injiziert und nach weiteren 10 Tagen erneut Blut entnommen.

Die γ -Immunglobuline (IgG) wurden über eine Protein A-Agarose-Affinitätssäule (Affi-Gel^(R), Biorad) gereinigt: Nach Bindung an die Säule wurden sie mit 0.1 M Natriumcitratpuffer, pH 2.8, eluiert, die Lösung mit Kaliumphosphat neutralisiert, auf das Ausgangsvolumen druckdialysiert, portioniert, eingefroren und bei -20° aufbewahrt.

3.2.1.2 Immunoblotting

Die Proben wurden auf SDS (Natriumlaurylsulfat)-Polyacrylamidgelen nach Schagger & von Jagow (1987) aufgetrennt; es wurden 20-200 μ g Mitochondrienprotein/Spur auf Gele von 0.75 mm Stärke aufgetragen. Wenn die aufzutragenden Mitochondrienpräparationen stark lipidhaltig waren, wurde das Lipid zuvor durch Extraktion mit Di-isopropylether entfernt.

Die zuerst von Towbin et al. (1979) beschriebene Methode des Immunoblottings wurde optimiert, um einen bestmöglichen Transfer aller Untereinheiten auf die verwendete Membran (Nitrocellulose (Bio-Rad) oder ImmobilonTM (Millipore)) und eine minimale unspezifische Reaktion der Antikörper zu erreichen:

Elektrophoretischer Transfer:

Puffer: 20 mM 6-Aminocapronsäure, 20% Methanol, mit 1 M Tris auf pH 8.3 eingestellt.

Das zu transferierende Gel wurde direkt nach der Elektrophorese verwendet, um Bandenverbreiterung durch Diffusion zu vermeiden. Um ein Quellen des Geles während des Transfers zu verhindern, wurde das Gel 5' im Transferpuffer vorgequollen. Die ImmobilonTM-Membran muß vor der Verwendung in reinem Methanol benetzt werden. Der Transfer erfolgte im Pufferbad bei 100 mA konstanter Stromstärke für ca. 1-2^h, bis die Spannung, die anfangs ca. 10 V betrug und kontinuierlich anstieg, nicht mehr zunahm.

Die Proteine wurden mit einer 1%igen Lösung von Ponceau-Rot S (Fluka) in 1% Essigsäure angefärbt. Der Hintergrund wurde mit 1% Essigsäure entfärbt und die Membran mit einem Grünfilter fotografiert. Zur vollständigen Entfärbung vor der Immunreaktion wurde bei der Nitrocellulosemembran 1% Ammoniumcarbonatlösung (pH 10) verwendet, bei der ImmobilonTM-Membran reines Methanol. Die Membranen konnten aufbewahrt und ohne Einschränkung für die Immunreaktion eingesetzt werden.

Immunreaktion:

TBS-Puffer: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.2.

1% Hämoglobin- (Hb-) Lösung: 10 g Rinderhämoglobin (Serva, lyophilisiert rein) wurde in 1 l TBS gelöst. Nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile wurde der Überstand filtriert und in 100 ml Portionen eingefroren.

Blocken: Die Membran wurde zuerst mit 2-3 ml/Spur 1% Hb-Lösung 1-2^h inkubiert.

Inkubation mit dem spezifischen Antikörper: Es wurden in der Regel 4 µl IgG/Spur eingesetzt. Die Inkubation erfolgte entweder in einer 1:500 Verdünnung in 1% Hb-Lösung für 1-2^h oder über Nacht in einer 1:5000 Verdünnung in 0.1% Hb-Lösung.

1. Waschen: Nach Abschütten der Antikörperlösung wurde 4 x 5' mit 0.1% Hb-Lösung gewaschen (2 ml/Spur).

Inkubation mit dem Sekundärantikörper: Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen IgG (Miles, aus der Ziege, affinitätsgereinigt) wurden mit 1% Hb-Lösung 1:2000 verdünnt (1 μ l/Spur) und 1-2^h inkubiert.

2. Waschen: Die Membran wurde mehrfach mit TBS + 5% Triton X-100 gewaschen, bis keine Hämoglobinreste mehr sichtbar waren.

Färbung nach de Blas & Cherwinski (1983): Für die Färbelösung wurden 50 mg 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in 75 ml 60 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.4, gelöst und 25 ml 20% Triton X-100 zugegeben. Nach Filtration wurden je 1 ml 2%ige Kobalt(II)chloridlösung und 2%ige Nickelsulfatlösung so langsam zugetropft, daß sich keine Präzipitate bildeten.

Die Membran wurde 10' in 50 ml der Färbelösung (3 ml/Spur) vorinkubiert. Zu den anderen 50 ml der Färbelösung wurden 5-10 μ l einer 10%igen Lösung von Harnstoffperoxid (Calbiochem) gegeben und die Membran bis zu einer ausreichenden Färbung (maximal ca. 30') darin inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

3.2.1.3 Immunopräzipitation

Für den enzymatischen Test der Hemmwirkung der IgG auf die Aktivität des bc₁-Komplexes wurde der Glycerin-freie bc₁-Komplex mit gleichen Volumina verschiedener Verdünnungen der IgG 10' inkubiert und ein Aliquot dieser Proben im Aktivitätstest eingesetzt.

Zur präparativen Immunopräzipitation wurde der bc_1 -Komplex zuerst durch Dialyse gegen 100 mM NaCl, 20 mM Mops, 0.1% TX-100, pH 7.2, vom Glycerin befreit. Aliquots des Komplexes wurden mit gleichen Volumina verschiedener Verdünnungen der Antikörper in 0.1% TX-100 versetzt, 10' inkubiert und das Präzipitat in einer Beckman Airfuge (Rotor A-100) 10' bei maximaler Drehzahl (ca. 100 000 g) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit Wasser gewaschen. Durch zweistündiges Schütteln des Präzipitats in 0.1 M Natriumcitratpuffer, pH 2.8, konnten die IgG aus den Antigen-Antikörper-Komplexen wieder gelöst werden. Der ausgefällte bc_1 -Komplex wurde dann durch erneutes Zentrifugieren bei ca. 100 000 g in der Beckman Airfuge abgetrennt und die so erhaltene IgG-Lösung mit Kaliumphosphat neutralisiert (Abb. 30).

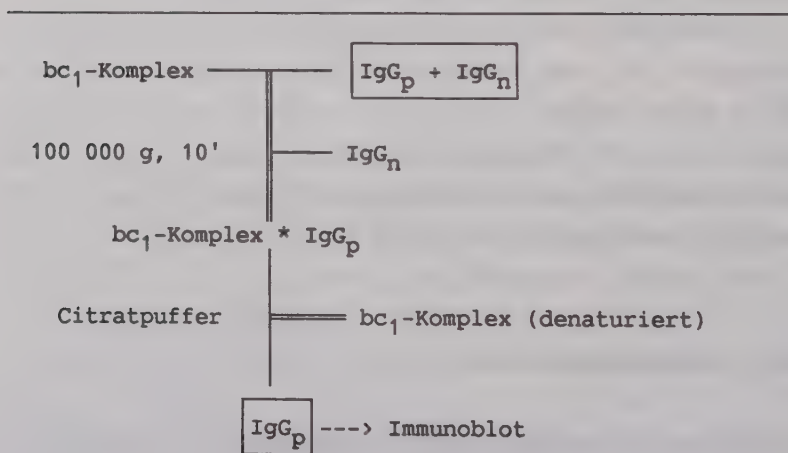


Abb. 30: Schema der Isolierung der präzipitierenden IgG (IgG_p).
 IgG_n: Nicht-präzipitierende IgG; —: Überstände;
 ==: Präzipitate.

3.2.2 Ergebnisse

3.2.2.1 Charakterisierung der IgG

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Reaktion der verwendeten spezifischen IgG im Immunoblot. Da die beiden "Core"-Proteine (Untereinheiten I und II) am stärksten antigen sind, reagier-

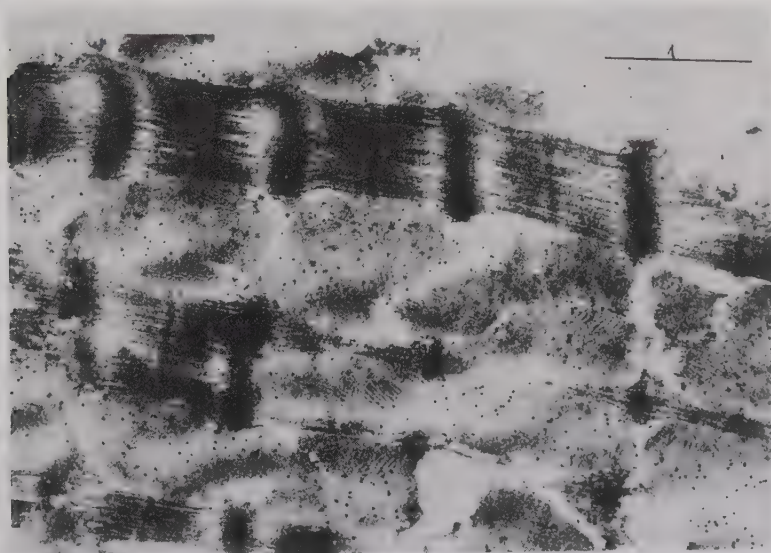


Abb. 31: Elektronenmikroskopische Abbildung eines Rattenherzmuskel-Dünnschnittes nach Inkubation mit IgG gegen den Rinderherz-bc₁-Komplex und Immunogold-Färbung. Zwischen den Muskelfasern sind Mitochondrien mit ihrer stark eingefalteten inneren Membran zu erkennen, an der die (schwarzen) Goldpunkte die Bindungsstellen der IgG anzeigen. Der Balken am oberen rechten Bildrand entspricht einer Länge von 1 μ m.

Tabelle 4: Reaktion der Antikörper gegen den Rinderherz-bc₁-Komplex bzw. seine Untereinheiten im Immunoblot.

IgG Nr.	Antigen	Untereinheit										
		I "Core"	II	III b	IV c ₁	V ISP	VI 13.4	VII 9.5	VIII 9.2	IX 8.0	X 7.2	XI 6.4
1	bc ₁ -K.	++	++	±	++	++	++	±	+	-	-	+
2	bc ₁ -K.	++	++	+	++	++	++	±	-	-	±	-
3	UE VI ^(13.4)	(++)	(++)	(+)	-	(+)	++	-	-	-	-	(±)
4	UE VI ^(13.4)	(++)	(++)	(+)	-	-	++	-	-	-	-	-
5	Cyt. b	(++)	(++)	++	-	(+)	-	-	-	-	-	-
6	Cyt. b	(++)	(++)	++	-	(+)	-	-	-	-	-	-
7	UE XI ^(6.4)	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	++
8	UE XI ^(6.4)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	++
9	Cyt. c ₁	(±)	(±)	-	+	(±)	-	-	(+)	-	-	-
10	Cyt. c ₁	(+)	(+)	-	++	(±)	-	-	-	-	-	-
11	ISP	(±)	(±)	-	-	++	-	-	-	-	-	-
12	ISP	(±)	(±)	-	-	++	(±)	-	-	-	-	-
13	UE I+II	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	UE I+II	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	SDS-bc ₁ -K.	++	++	+	+	+	-	+	-	-	+	-
16	SDS-bc ₁ -K.	++	++	+	+	++	+	+	-	-	+	-
17	Cyt. b	(++)	(++)	++	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-
18	UE VI-XI	(+)	-	-	-	(±)	++	++	?	-	++	-
19	UE VI-XI	-	-	-	-	(±)	++	?	++	-	++	-
20	UE VIII ^(9.2)	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
21	UE VIII ^(9.2)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

++: Starke Reaktion; +: Reaktion; ±: schwache Reaktion;
(++),(+),(±): spezifische, aber bei der Immunisierung nicht beabsichtigte Nebenreaktion.

ten die meisten IgG-Präparationen auch mit diesen beiden Untereinheiten. Mit der Untereinheit IX^(8.0) war in keiner IgG-Fraktion eine Reaktion zu beobachten.

Um die Reaktion der IgG gegen den Gesamtkomplex *in situ* zu testen, wurden histologische Dünnschnitte von Rattenherzmuske-
fasern mit IgG Nr. 1 umgesetzt. Die an den bc_1 -Komplex in der
inneren Mitochondrienmembran gebundenen IgG waren nach Im-
munogold-Färbung im elektronenmikroskopischen Bild zu erkennen
(Abb. 31).

Die einzigen IgG, die im enzymatischen Test die Ubihydro-
chinon: Cytochrom c-Reduktase-Aktivität hemmten, waren die IgG
gegen den nativen bc_1 -Komplex (Nr. 1 und 2). Die Hemmung be-
ruhte darauf, daß die Cytochrom c-Bindungsstellen des bc_1 -Kom-

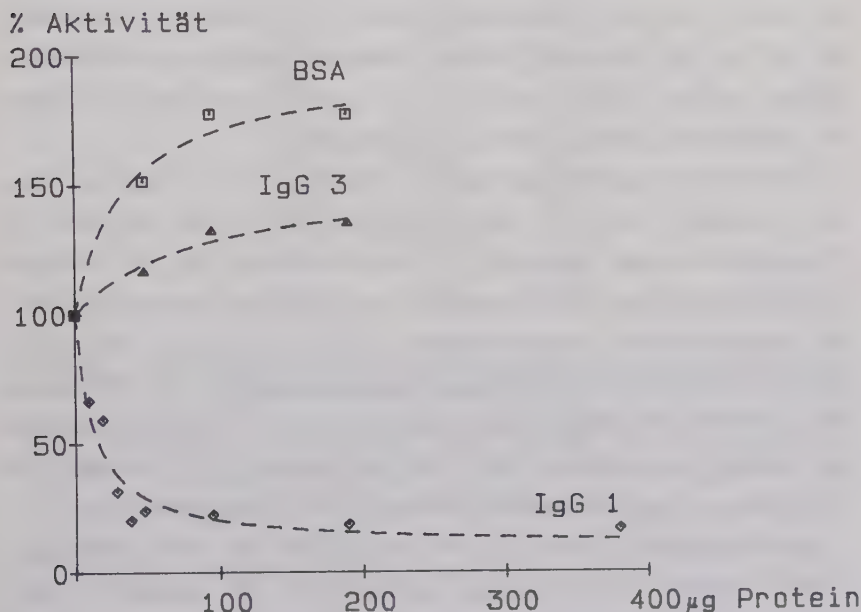


Abb. 32: Veränderung der Aktivität des bc_1 -Komplexes bei Zugabe verschiedener Mengen von IgG Nr. 1, Nr. 3 und Rinderserumalbumin (BSA).

plexes für Cytochrom c unzugänglich wurden (Steer, 1986). Alle anderen IgG (auch die gegen SDS-denaturierten Gesamtkomplex gebildeten, Nr. 15 und 16) bewirkten eine leichte Zunahme der Cytochrom c-Reduktionsrate; dieser Effekt war durch eine unspezifische Aktivierung durch das zugesetzte Protein bedingt und wurde auch bei Zugabe von Rinderserumalbumin beobachtet (Abb. 32).

Für die Nicht-Hemmung der Enzymaktivität durch die Antikörper gegen die isolierten oder denaturierten Untereinheiten gibt es zwei mögliche Erklärungen: (i) die IgG binden nicht an die Oberfläche des intakten Komplexes oder (ii) die IgG binden zwar, die Bindung führt aber nicht zu einer Hemmung der Enzymaktivität. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Bindung verschiedener IgG an den bc_1 -Komplex mittels Immunopräzipitation untersucht. Hierbei wurden zuerst die IgG Nr. 1 und 2 untersucht, da diese als einzige den Gesamtkomplex präzipitierten.

Rinderherz- bc_1 -Komplex wurde mit IgG Nr. 1 versetzt, das sich bildende Präzipitat abzentrifugiert und nach Waschen in Citratpuffer wieder aufgelöst. Die so erhaltenen IgG (im Folgenden "präzipitierende IgG" genannt) reagierten im Immunoblot mit den entsprechenden Untereinheiten des bc_1 -Komplexes; die eingesetzten Ausgangs-IgG waren vollständig entweder im Präzipitat oder im Präzipitationsüberstand nachweisbar. Die präzipitierenden IgG konnten ein weiteres Mal mit dem nativen bc_1 -Komplex zur Reaktion gebracht werden und präzipitierten dann vollständig.

Im Immunoblot waren in den präzipitierenden IgG Antikörper gegen folgende Untereinheiten nachweisbar: die beiden "Core"-Proteine ("Core"-Protein II stärker als "Core"-Protein I), Cytochrom c_1 , das ISP und gegen die Untereinheiten VIII^(9.2) und

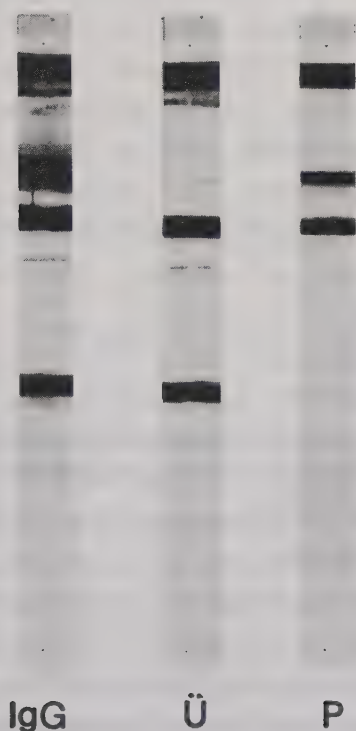


Abb. 33: Immunopräzipitation des Rinderherz-bc₁-Komplexes mit IgG gegen den Gesamtkomplex (Nr. 1). Der Nachweis erfolgte durch Western-Blot mit bc₁-Komplex als Antigen. IgG: IgG Nr. 1 vor Immunopräzipitation; Ü: Überstand (nicht präzipitierte IgG); P: Präzipitat nach Auflösung in Citratpuffer.

XI^(6.4). Die IgG gegen die Untereinheit VI^(13.4) (postuliertes Chinon-bindendes Protein "QP-C") blieben fast vollständig im Präzipitationsüberstand (Abb. 33).

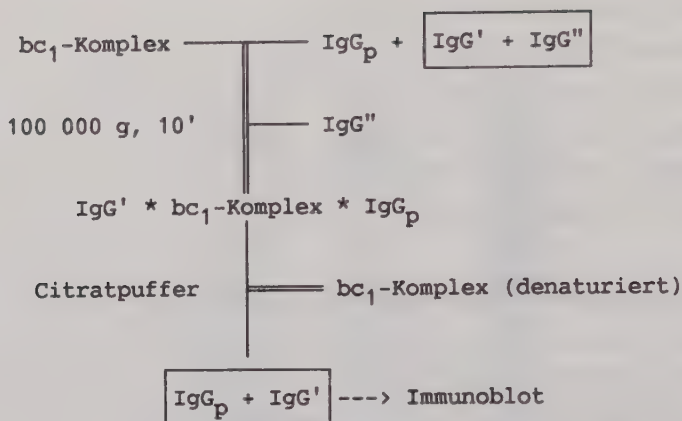


Abb. 34: Untersuchung der Bindung nicht-präzipitierender IgG an den bc₁-Komplex durch Copräzipitation mit präzipitierenden IgG (IgG_p).
 IgG', IgG'': Nicht-präzipitierende IgG; —: Überstände;
 ==: Präzipitate.

Durch Co-Präzipitation der präzipitierenden IgG mit anderen IgG-Präparationen ließ sich auch die Bindung nicht-präzipitierender IgG an den bc₁-Komplex untersuchen. Hierdurch konnten die 11 Untereinheiten des Rinderherz-bc₁-Komplexes nach ihrem Verhalten in drei Gruppen unterteilt werden:

- (i) IgG gegen die beiden "Core"-Proteine, Cytochrom c₁, das ISP und die Untereinheiten VIII^(9.2), X^(7.2) und XI^(6.4) reagierten zum überwiegenden Teil mit dem bc₁-Komplex;
- (ii) IgG gegen die Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C") reagierten schwach mit dem bc₁-Komplex;
- (iii) IgG gegen Cytochrom b und die Untereinheit VII^(9.5) reagierten nicht mit dem bc₁-Komplex.

Die Untereinheit IX^(8.0) ließ sich auf diese Weise nicht untersuchen, da keine IgG nachweisbar waren.

Die Versuche zeigten, daß auch solche IgG-Fraktionen an die Oberfläche des Komplexes banden, die die enzymatische Aktivität nicht hemmten; die Hemmung der IgG gegen den gesamten bc₁-Komplex wurde also nicht durch die Bindung an bestimmte Untereinheiten verursacht, sondern, wie bereits aus anderen Untersuchungen abgeleitet, durch die Aggregation des Komplexes und die daraus resultierende Abdeckung der Cytochrom c-Bindungsstelle (vgl. S. 63).

Die Untereinheit VIII^(9.2), das sogenannte "hinge"-Protein, scheint nicht die primäre Cytochrom c-Bindungsstelle zu bilden, da die IgG gegen diese Untereinheit trotz Bindung an den nativen bc₁-Komplex nicht zu einer Hemmung führten.

Die Ergebnisse für die Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C") unterscheiden sich von denjenigen, die von Japa et al. (1987) berichtet wurden. In ihren Experimenten bewirkte ein Antikörper gegen die homologe Untereinheit VII^(14.4) aus Hefe, der in submitochondrialen Partikeln mit dem Hefe-bc₁-Komplex reagierte, eine partielle Hemmung der Ubihydrochinon: Cytochrom c-Reduktase-Aktivität und der Cytochrom b-Reduktion in Gegenwart von Antimycin.

Versuche, die Lokalisierung der einzelnen Untereinheiten in Proteoliposomen oder submitochondrialen Partikeln über die IgG-Bindung zu testen, führten zu keinem aussagekräftigen Ergebnis, da die IgG auch mit leeren Phospholipidvesikeln reagierten.

3.2.2.2 Vergleichende Immunoblots

Zur Untersuchung der Untereinheitenzusammensetzung wurden Mitochondrien aus verschiedenen Organismen und Geweben isoliert, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Immunoblotting auf ihre Kreuzreaktivität mit den IgG gegen den gesamten Rinderherz-bc₁-Komplex (Nr. 1) und gegen die Untereinheiten VI - XI (Nr. 19) getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Kreuzreaktivität verschiedener Mitochondrienpräparationen oder bc-Komplexe mit IgG gegen den gesamten Rinderherz-bc₁-Komplex (IgG 1: +) und gegen seine kleinen Untereinheiten (IgG 19: °).

Mitochondrien bzw. bc-Komplexe	Untereinheit										
	I "Core"	II	III b	IV c ₁	V ISP	VI 13.4	VII 9.5	VIII 9.2	IX 8.0	X 7.2	XI 6.4
bc ₁ , Rinderherz	+	+	+	+	+	+°	+	+°	0	°	+
Rinderherz	+	+	+	+	+	+°	+	+°	0	°	+
Kalbsleber	+	+ ²	+	+	+	+°	-	+°	0	°	+
Rattenherz	+	+	-	±	+	+°	-	±	0	°	+
Rattenleber	+	+ ²	-	±	+	+°	-	±	0	°	+
Hamsterherz	+	+	-	+	+	+	-	?	0	?	?
Hamsterleber	+	+	-	+	+	+	-	?	0	?	?
Braunes Fett, Hamster	+	+	-	+	+	+°	-	°	0	°	+
Hühnerherz	±	+	-	-	+	+±	-	-	0	°	?
Karpfenleber	+	?	-	-	+	-	-	-	0	-	-
bc ₁ , <i>N.crassa</i>	+	+	?	-	+	+	-	-	0	±	-
bc ₁ , <i>S.cerevisiae</i>	+	-	?	-	±	-	-	-	0	-	-
b ₆ f, Spinat	-	-	-	+	±	-	-	-	0	-	-

+, °: Reaktion; ±, ±: schwache Reaktion; -: keine Reaktion; ?: Reaktion fraglich; 0: Keine IgG; ²: Doppelbande (s. Text). Beim Spinat-b₆f-Komplex reagiert die größte Bande, das Cytochrom f, mit den IgG Nr. 1 (s. Text).

Zusammengefaßt ergab sich:

- In allen Mitochondrien reagierte mindestens ein "Core"-Protein und das "Rieske"-Eisen-Schwefel-Protein; das zweite "Core"-Protein reagierte nur bei den Fisch-Mitochondrien nicht.
- Im Bereich der Cytochrome b und c_1 war in allen Säugetier-Mitochondrien mindestens eine Bande zu erkennen; die Zuordnung von Cytochrom b und Cytochrom c_1 war jedoch nicht immer eindeutig möglich, da die beiden Proteine wegen des "abnormalen" Laufverhaltens des Cytochrom b (Loderbauer, 1983) trotz ihrer unterschiedlichen Größen (43 kDa gegen 28 kDa) im SDS-Gel eng benachbart waren.
Das Cytochrom f des b_6f -Komplexes reagierte mit dem Antikörper gegen den nativen Rinderherz- bc_1 -Komplex, obwohl keine Sequenzhomologie zwischen Cytochrom f und dem analogen Cytochrom c_1 des Rinderherz-Komplexes besteht.
- Die Untereinheit VI^(13,4) ("QP-C") reagierte nur in den Fisch-Mitochondrien, im Hefe- bc_1 -Komplex und im Spinat b_6f -Komplex nicht. Im *Neurospora crassa*- bc_1 -Komplex lief die Bande bei etwas größerer Masse (ca. 14 kDa gegen 13.4 kDa beim Rinderherz); bei verschiedenen Tier-Mitochondrien war kein Größenunterschied feststellbar.
- Im Bereich der kleinen Untereinheiten waren weiterhin in allen untersuchten Säugetier-Mitochondrien Banden zu erkennen, die den zum c_1 -Subkomplex gehörenden Untereinheiten VIII^(9,2) und X^(7,2), sowie der Untereinheit XI^(6,4) entsprachen; die Untereinheit X^(7,2) reagierte zusätzlich auch in den Hühnerherz-Mitochondrien und im *Neurospora crassa*- bc_1 -Komplex (schwach). Die Untereinheit XI^(6,4) ließ sich in den Präparationen, die wegen ihres hohen Lipidgehaltes mit Ether vorextrahiert wurden, nicht nachweisen.

hiert werden mußten, nicht nachweisen, da sie offensichtlich bei der Extraktion verloren geht.

- Über zwei Untereinheiten konnten keine Aussagen getroffen werden: Die IgG gegen die Untereinheit VII^(9.5) reagierten so schwach, daß die Reaktion schon in den Rinderherz-Mitochondrien nicht mehr nachgewiesen werden konnte, und gegen die Untereinheit IX^(8.0) waren keine IgG nachweisbar.

Die Kreuzreaktionen der verschiedenen mitochondrialen bc₁-Komplexe mit den IgG gegen den Rinderherz-bc₁-Komplex sowie die Lage der reagierenden Banden zeigten, daß alle tierischen bc₁-Komplexe eine sehr ähnliche Untereinheitenzusammensetzung und auch, soweit feststellbar, eine ähnliche Größe der einzelnen Untereinheiten aufweisen. Es wurde eine abgestufte Reagibilität vom Säugetier über den Vogel bis zum Fisch beobachtet, die parallel zur entwicklungsgeschichtlichen Verwandtschaft verläuft.

Die bc₁-Komplexe aus Pilzen zeigten geringere Kreuzreaktivität, wobei die Unterschiede zwischen Hefe und *Neurospora crassa* auffallen: Während im Hefe-Komplex nur ein "Core"-Protein und keine der kleinen Untereinheiten reagierten, waren im *N. crassa*-Komplex beide "Core"-Proteine und zwei kleine Untereinheiten (entsprechend den Untereinheiten VI^(13.4) und X^(7.2)) zu erkennen. Damit zeigte der *N. crassa*-Komplex eine stärkere Kreuzreaktion als die Fischmitochondrien. In bakteriellen Membranen (*Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter capsulatus* und *Halobacterium halobium*, nicht dargestellt) wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet, während das Cytochrom f des isolierten b₆f-Komplexes reagierte; dieser Unterschied könnte aber durch unterschiedliche aufgetragene Konzentrationen (ganze Membranen gegenüber isoliertem Komplex) bedingt sein.

Um zu testen, ob es im bc_1 -Komplex Isoenzyme gibt, wie sie von Kadenbach et al. (1986) für die Cytochrom c-Oxidase beschrieben worden sind, wurden von zwei Ratten Mitochondrien aus verschiedenen Geweben (Herz, Leber, Gehirn, Niere) isoliert und diese im Immunoblot getestet; hierbei zeigte keine der Banden ein unterschiedliches Verhalten in den verschiedenen Organen. Auch beim Vergleich von Herz- und Leber-Mitochondrien aus neugeborenen und adulten (6 Wochen alten) Hamstern ergaben sich keinerlei Hinweise auf das Vorliegen von Isoenzymen. Für dieses Verhalten gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder (i) traten die Isoenzyme im Immunoblot nicht in Erscheinung (gleiches Laufverhalten der Untereinheiten im SDS-Gel und identische immunogene Determinanten) oder (ii) es gibt keine Isoenzyme, zumindest nicht in den getesteten Systemen.

3.3 Dissoziationsexperimente

Die Dissoziationsexperimente wurden am isolierten Rinderherz- bc_1 -Komplex in Triton X-100 (TX-100) durchgeführt. Die unter verschiedenen Bedingungen inkubierten Ansätze wurden über Sucroседichtegradienten aufgetrennt und die Gradientenfraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese, Spektralanalyse und Enzymaktivitätstest untersucht.

3.3.1 Methoden

Frisch präparierter bc_1 -Komplex wurde durch Dialyse gegen 100 mM NaCl, 20 mM Mops, 1 mM NaN_3 , pH 7.2, ausgefällt und in einer Konzentration von ca. 200 μ M Cytochrom b in 100 mM NaCl, 25 mM Mops, 0.5% TX-100, 0.2 mM PMSF {Phenylmethylsulfonylfluorid}, 1 mM NaN_3 , pH 7.2, gelöst. Jeweils 1 ml dieses Komplexes wurde mit 1 ml Salzlösung (doppelte Endkonzentration) versetzt, 3-4' im Eisbad inkubiert und dann auf Sucroседichtegradienten (38 ml) mit einer Dichte von $d=1.1$ bis $d=1.2$ mit der entsprechenden Salzkonzentration aufgetragen. Die Tritonkonzentration in den Gradienten betrug, sofern nicht anders angegeben, 0.1%. Die Gradienten wurden 18^h bei 46 000 UpM in einem Rotor V50Ti bei 5°C zentrifugiert, anschließend von unten ausgepumpt und in 30 Fraktionen à 1.3 ml aufgeteilt.

3.3.2 Ergebnisse

Zur Kontrolle wurde der Komplex mit 100 mM NaCl inkubiert und über einen Gradienten mit 100 mM NaCl, 0.1% TX-100 zentrifugiert. Die Hauptfraktion (Nr. 9, Abb. 35) zeigte einen fast intakten bc_1 -Komplex, von dem nur die Untereinheit $XI^{(6.4)}$ teilweise abdissoziiert war. Das Cytochrom b-Spektrum war zu 85% erhalten (bezogen auf die Cytochrom c_1 -Konzentration), das Maximum lag bei 562 nm (Auftrag: 563 nm). Die Aktivität betrug nur noch 15% derjenigen des Ausgangsmaterials; Zugabe der Fraktion 16 (hauptsächlich Untereinheit $XI^{(6.4)}$) bewirkte eine Reaktivierung auf 60% und der Fraktion 26 (abdissoziiertes Phospholipid) auf 120% der Ausgangsaktivität.

Durch Dissoziation mit 1.7 M Harnstoff, 250 mM NaCl, wurde außer der Untereinheit $XI^{(6.4)}$ noch das "Rieske"-Eisen-Schwefel-Protein vollständig und die Untereinheit $VI^{(13.4)}$ ("QP-C") zum Teil abgespalten (Abb. 36); diese Bedingungen entsprechen den von

Abb. 35 - 39 (folgende Seiten): Sucrose-Dichtegradienten unter verschiedenen Dissoziationsbedingungen.

200 nMol bc_1 -Komplex wurden unter verschiedenen Salzbedingungen inkubiert und auf Gradienten von $d=1.1$ bis 1.2 aufgetragen (s. Methoden). Nach der Zentrifugation (18^h bei 46 000 UpM im Rotor VTi 50) wurde der Gradient fotografiert (A). Jede zweite Fraktion wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger & von Jagow (1987) aufgetragen (B). Von den Hauptfraktionen wurden die Cytochromspektren aufgenommen (C): Cyt. c_1 = Ascorbat-reduziert - Ferricyanid-oxidiert; Cyt. $b + c_1$ = Dithionit-reduziert - Ferricyanid-oxidiert; Cyt. b = Dithionit-reduziert - Ascorbat-reduziert. (D) zeigt die Nonyl-ubihydrochinon: Cytochrom c -Reduktase-Aktivität der Hauptfraktion bzw. deren Reaktivierbarkeit bei Zugabe der angegebenen Fraktionen.

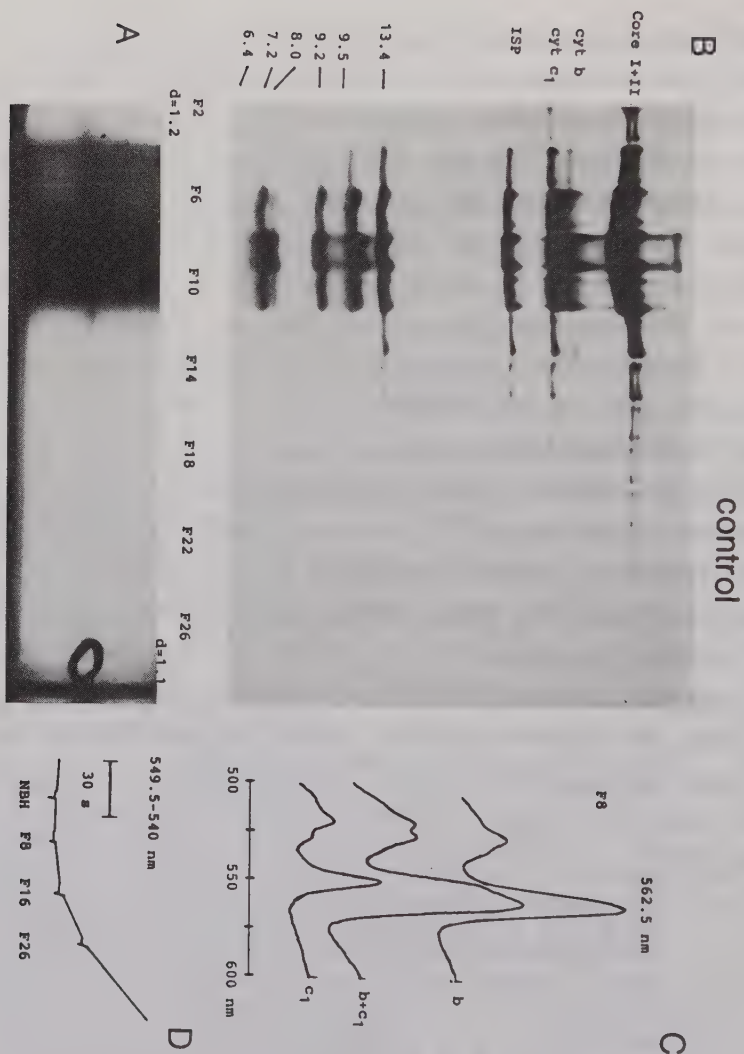
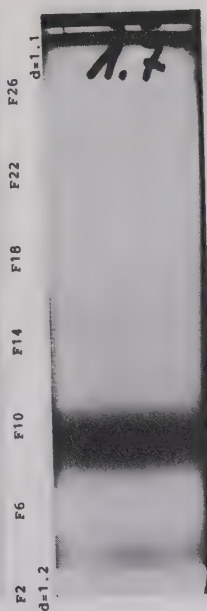


Abb. 35: Dissoziationsgradient 100 mM NaCl.

1.7 M urea

B

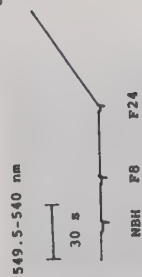
Core I+II
cyt b
cyt c₁
ISP



C



D



A

Abb. 36: Dissoziationsgradient 1.7 M Harnstoff.

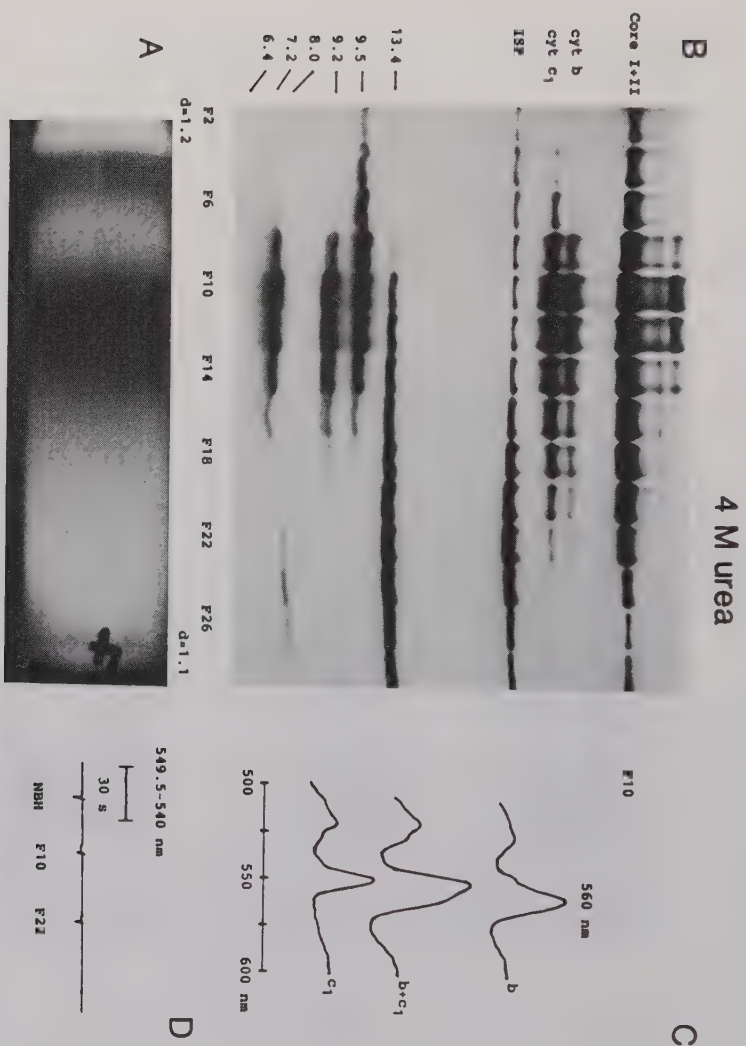


Abb. 37: Dissoziationsgradient 4 M Harnstoff.

1.5 M guanidine

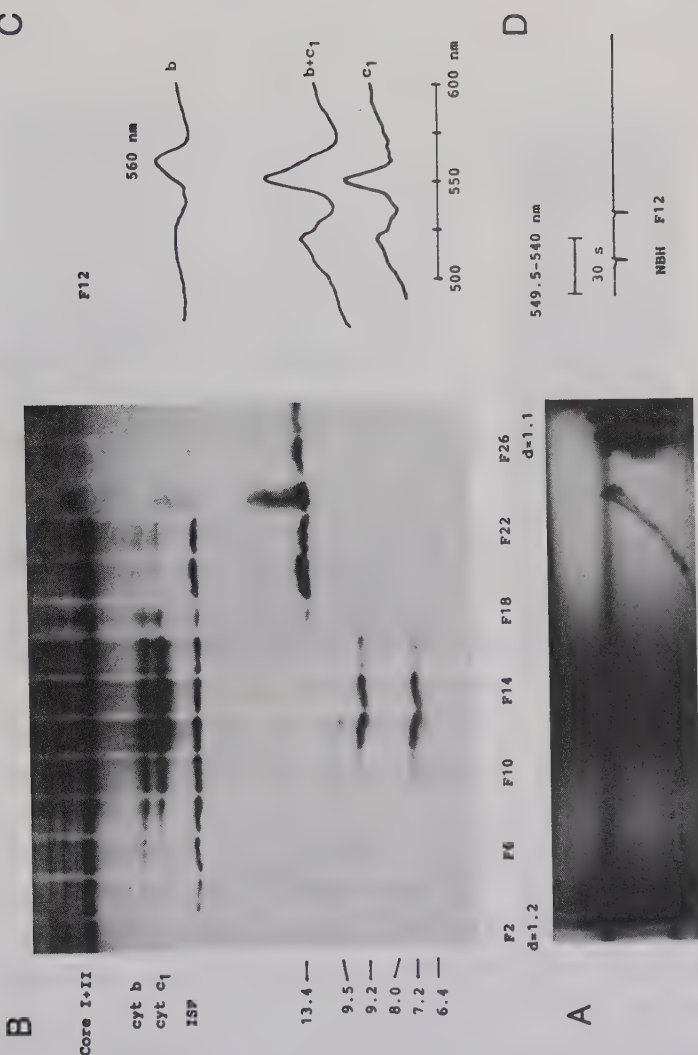


Abb. 38: Dissoziationsgradient 1.5 M Guanidin.

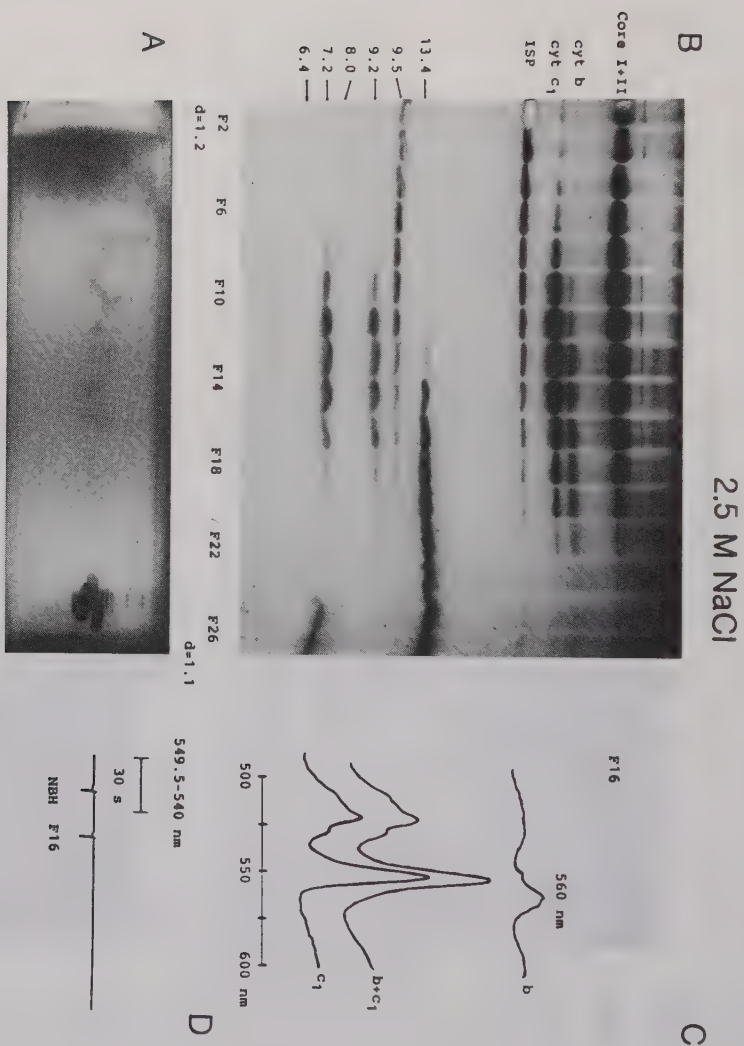


Abb. 39: Dissoziationsgradient 2.5 M NaCl.

Engel et al. (1983a) angegebenen für die Isolierung des Eisen-Schwefel-Proteins. Das Cytochrom b-Spektrum war unter diesen Bedingungen zu ca. 50% erhalten, das Maximum lag bei 562 nm. Die asymmetrische Spektrenform ließ auf das Vorliegen beider Häm-Absorptions-Banden des Cytochrom b schließen. Die Hauptfraktion zeigte keine Aktivität mehr; diese ließ sich jedoch durch Zugabe der Eisen-Schwefel-Protein-haltigen Fraktion 26 wieder zu 75% der Aktivität des Auftrags rekonstituieren.

Bei der Dissoziation durch 4 M Harnstoff, 250 mM NaCl, betrug die Absorption im Cytochrom b-Spektrum ebenfalls ca. 50% der Ausgangsabsorption, das Maximum lag jedoch bei 560 nm und die symmetrische Spektrenform ließ keine unterschiedlichen Absorptionen der beiden Hämgruppen mehr erkennen. Es war keine rekonstituierbare Aktivität mehr festzustellen.

Unter diesen Bedingungen wurden die Untereinheit VI^(13.4) vollständig und zusätzlich die Untereinheiten VII^(9.5) und IX^(8.0) abgespalten (Abb. 37). Während die Untereinheit IX^(8.0) ebenso wie die anderen dissoziierten Untereinheiten im Gradienten oberhalb der Bande des bc₁-Komplexes, d.h. bei niedrigerem Molekulargewicht, erschienen, sedimentierte die Untereinheit VII^(9.5) schneller als der Restkomplex und lag demzufolge offensichtlich in stark aggregierter Form vor.

Das unterschiedliche Aggregations- und Löslichkeitsverhalten der einzelnen Untereinheiten wurde zusätzlich untersucht, indem die mit 4 M Harnstoff, 250 mM NaCl in 0.5% Triton X-100 inkubierte Probe auf einen Gradienten ohne Detergens aufgetragen wurde. Während der aggregierte bc₁-Komplex schnell an die Wand des Röhrchens wanderte, blieben im Gradienten folgende abgespaltene Untereinheiten zurück (Abb. 40): "Core"-Protein II (teilweise),

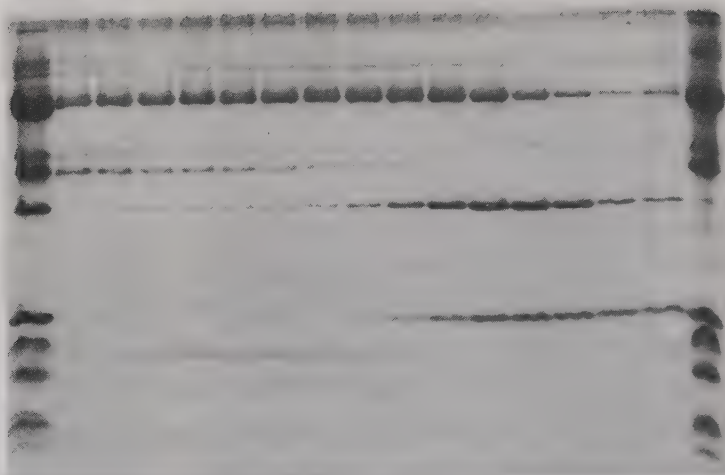


Abb. 40: SDS-Gelelektrophorese des Sucrose-Dichtegradienten mit 4 M Harnstoff ohne Triton.
Die Inkubation erfolgte in 0.5% Triton X-100, 4 M Harnstoff.

das Eisen-Schwefel-Protein und die Untereinheiten $\text{VI}^{(13.4)}$, $\text{VII}^{(9.5)}$, $\text{IX}^{(8.0)}$ und $\text{XI}^{(6.4)}$. Hierbei erschienen die Untereinheiten $\text{XI}^{(6.4)}$ (überwiegend) und $\text{VII}^{(9.5)}$ weit unten im Gradienten, d.h. aggregiert, während die anderen Untereinheiten und ein Teil der Untereinheit $\text{XI}^{(6.4)}$ ihrem Molekulargewicht entsprechend weit oben im Gradienten waren.

Bei Dissoziation durch 1.5 M Guanidin, 250 mM NaCl entstand ein ähnliches Spaltungsmuster, d.h., das Eisen-Schwefel-Protein und die Untereinheiten $\text{VI}^{(13.4)}$, $\text{VII}^{(9.5)}$, $\text{IX}^{(8.0)}$ und $\text{XI}^{(6.4)}$ waren abge-

spalten (Abb. 38). Die Cytochrom b-Absorption war auf $\frac{1}{4}$ des ursprünglichen Wertes abgefallen.

Die stärkste Dissoziation wurde bei Inkubation mit hohen Salzkonzentrationen beobachtet (0.3 M LiClO_4 , 2.5 M LiCl und 2.5 M NaCl mit zunehmender Dissoziationswirkung). Mit allen drei Salzen war fast keine Cytochrom b-Absorption mehr festzustellen (<10% des Ausgangswertes). Außer der bereits mit Guanidin beobachteten Abspaltung von 5 Untereinheiten wurde aber zusätzlich eine beginnende Auftrennung der "Core"-Proteine, des Cytochrom b-Apoproteins und des Cytochrom c_1 -Subkomplexes (bestehend aus Cytochrom c_1 sowie den Untereinheiten VIII^(9.2) und X^(7.2)) beobachtet (Abb. 39).

Durch den Vergleich dieser Dissoziationsexperimente mit den Ergebnissen der Isolierung des Cytochrom b (von Jagow et al., 1978a,b), des Eisen-Schwefel-Proteins (Trumpower & Edwards, 1979; Engel et al., 1983a) sowie aller elf Untereinheiten mittels Hydroxyapatitsäulenchromatographie (Schägger et al., 1986) läßt sich folgendes ableiten:

- Die Untereinheit XI^(6.4) ließ sich als einzige unter milden Bedingungen ohne Verlust der enzymatischen Aktivität des bc_1 -Komplexes abspalten.
- Der nach Abspaltung des Eisen-Schwefel-Proteins verbleibende bc_1 -Subkomplex war strukturell noch intakt, wie das Cytochrom b-Absorptionsmaximum von 562 nm zeigte. Der bc_1 -Subkomplex besaß kein funktionelles Q_o -Zentrum (Ubihydrochinon-Oxidationszentrum) mehr, während das Q_i -Zentrum noch mit Chinonen reagieren konnte; die Ubihydrochinon:Cytochrom c-Reduktase-Aktivität ließ sich aber durch Zugabe des Eisen-Schwefel-Proteins wieder rekonstituieren.

- Die zur Abspaltung weiterer Untereinheiten ($\text{VI}^{(13.4)}$, $\text{VII}^{(9.5)}$ und $\text{IX}^{(8.0)}$) notwendigen Bedingungen führten zu einem vollständigen Verlust der Chinon-Reaktionsfähigkeit und zu einem veränderten Absorptionsspektrum des Cytochrom b mit einem Maximum von 560 nm. Dies entspricht dem des isolierten Cytochrom b, das CO-reaktiv ist und ein positiveres Redox-potential hat (von Jagow et al., 1978b).

Der Vergleich mit dem säulenchromatographischen Trennungsgang legt die Vermutung nahe, daß das Cytochrom b unter diesen Bedingungen isoliert vorlag; dies würde bedeuten, daß das Auftreten von Cytochrom b und Cytochrom c_1 in einer Gradientenfraktion durch ähnliche hydrodynamische Eigenschaften der isolierten und eventuell dimerisierten Untereinheiten bedingt war.

- Vier Untereinheiten blieben auch ohne zugesetztes Detergens in Lösung: das "Core"-Protein II, das Eisen-Schwefel-Protein und die Untereinheiten $\text{VI}^{(13.4)}$ ("QP-C") und $\text{IX}^{(8.0)}$. Ob es sich bei diesen Untereinheiten um wirkliche wasserlösliche Untereinheiten (als Monomere oder als kleine Aggregate vorliegend) handelt, oder ob das gebundene Detergens ausreichte, um sie in Lösung zu halten, läßt sich auf der Basis der vorliegenden Experimente nicht entscheiden. Der Befund, daß zur Ablösung des Eisen-Schwefel-Proteins ein Triton-haltiger Puffer benötigt wurde (Engel et al., 1983a), deutet darauf hin, daß wenigstens diese Untereinheit ohne Detergens nicht löslich ist.
- Im Gegensatz zu diesen vier Untereinheiten war die Untereinheit $\text{XI}^{(6.4)}$ ohne Detergens nicht löslich, die Untereinheit $\text{VII}^{(9.5)}$ fiel sogar in Gegenwart von 0.1% TX-100 aus.

3.4 Proteolytischer Verdau

Den Proteaseverdauxperimenten lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

- Welche Untereinheiten sind an der Oberfläche des Multiproteinkomplexes exponiert?
- Welche Untereinheiten liegen (ganz oder teilweise) auf der cytosolischen und welche Untereinheiten liegen auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran?
- Auf welcher Seite der Membran liegen die N- bzw. C-Termini der einzelnen Untereinheiten?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sollte zuerst die Empfindlichkeit der einzelnen Untereinheiten gegenüber verschiedenen Proteasen am isolierten bc_1 -Komplex in der Triton-Micelle festgestellt werden. Diese Ergebnisse sollten dann dazu verwendet werden, die Orientierung der Untereinheiten in der Membran im rekonstituierten System (bc_1 -Komplex in Phospholipidvesikeln) zu ermitteln.

Die Lage der N- und C-Termini sollte durch den Verdau mit Aminopeptidase bzw. Carboxypeptidase im rekonstituierten System untersucht werden.

3.4.1 Methoden

Verdaupuffer: 100 mM NaCl, 20 mM Puffer. Der Puffer und der eingestellte pH-Wert hingen vom pH-Optimum der eingesetzten Protease ab:

- Carboxypeptidase Y, Papain, Proteinase K (alle Boehringer, Mannheim): Mes, pH 6.2;

- Aminopeptidase M, Chymotrypsin (beide Boehringer, Mannheim): Mops, pH 7.0;
 - Thermolysin (Serva, Heidelberg): Mops, pH 7.2;
 - Subtilisin (Boehringer, Mannheim), Trypsin (Merck, Darmstadt): Triethanolamin, pH 8.0;
 - Elastase (Boehringer, Mannheim): Triethanolamin, pH 8.5.
- Cholatlösung: (10%, w/v): 9.8 g Desoxycholsäure und 1.4 g KOH in 100 ml Wasser, auf pH 8.0 eingestellt.

Inkubationsmedium I: 8 M Harnstoff, 12% SDS {Natriumlaurylsulfat}, 6% 2-Mercaptoethanol, 200 mM Tris, pH nicht eingestellt.

Inkubationsmedium II: 75 mM Tris, 0.02% Bromphenolblau, pH 6.8.

Isolierter bc_1 -Komplex wurde mit dem entsprechenden Verdau-puffer auf eine Konzentration von $4 \mu\text{M}$ Cytochrom b verdünnt. Vesikel wurden 1^h gegen den entsprechenden Verdau-puffer dialysiert und dann auf die gleiche Cytochrom b-Konzentration verdünnt. Die Protease wurde in eiskaltem Verdau-puffer gelöst und auf das 6-fache der gewünschten Endkonzentration im Verdauansatz verdünnt. Es wurden pro Ansatz 500 μl der Proteinprobe in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und der Verdau mit 100 μl der Proteaselösung gestartet. Nach der gewünschten Reaktionszeit wurden zuerst 20 μl der Cholatlösung unter Schütteln zugegeben und die Reaktion dann sofort mit 600 μl eiskalter 15%iger (w/v) Trichloressigsäure gestoppt. Die Menge an Cholatlösung wurde entsprechend reduziert, wenn im Verdauansatz bereits Cholat zugesetzt worden war. Die folgende Aufarbeitung geschah in der Kälte: Das gefällte Protein wurde zuerst zweimal 2' in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert, dann einmal (Vesikel zweimal) 30' mit 0.5 ml Diisopropylether oder Methyl-t-butylether

gewaschen, wieder zweimal 2' abzentrifugiert, mit 0.5 ml Wasser 30' gewaschen, zweimal 2' abzentrifugiert, das Pellet zum Auflösen in 40 μ l Inkubationsmedium I 60' geschüttelt und mit 80 μ l Inkubationsmedium II verdünnt. Von dieser Lösung wurden 10 μ l (entsprechend 20 μ g bc₁-Komplex) pro Spur auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die angegebene Arbeitsvorschrift ist das Ergebnis einer Versuchsreihe zur Optimierung der Fällung von Membranproteinen. Die Zugabe von Cholat vor der Fällung bewirkt, daß sich das Pellet leichter wieder auflösen läßt. Eine Verarbeitung der gefällten Probe bei höheren Temperaturen (Raumtemperatur oder höher) würde zur irreversiblen Aggregation einiger Proteine führen, die dann im Gel an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel liegenblieben.

3.4.2 Ergebnisse

Zuerst wurde die Wirkung verschiedener Proteasen auf den gelösten bc₁-Komplex untersucht. Von den getesteten Proteasen wurde bei Raumtemperatur und Inkubationszeiten bis zu vier Stunden nicht der gesamte bc₁-Komplex abgebaut, da sich die meisten Untereinheiten unter diesen Bedingungen als stabil erwiesen. Mit Chymotrypsin, Subtilisin, Thermolysin und Trypsin wurden folgende proteolytische Spaltungen beobachtet (Abb. 41):

- "Core"-Protein II: sehr schnelle Abspaltung von ca. 2 kDa (mit allen Proteasen außer Trypsin), dann Spaltung in zwei Banden mit ca. 18 und 20 kDa;
- Eisen-Schwefel-Protein: Mit Trypsin und Thermolysin Abbau zu einem 15 kDa-Fragment (sehr langsam);

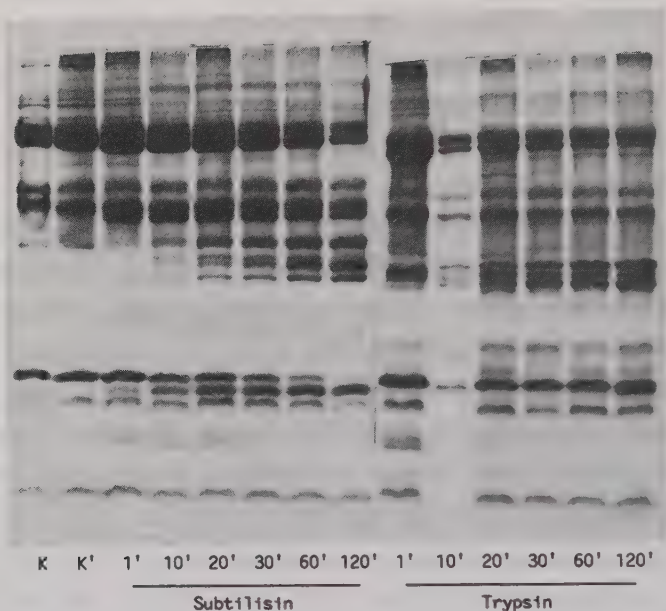


Abb. 41: Proteaseverdau des bc_1 -Komplexes mit Subtilisin und Trypsin ohne zugesetztes Detergens. Die Protease-Endkonzentration betrug 0.1 mg/ml. K: Referenz- bc_1 -Komplex; K': bc_1 -Komplex, mit Trichlor-essigsäure gefällt.

-
- Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C"): Abspaltung von ca. 1 kDa (nicht mit Chymotrypsin);
 - Untereinheit XI^(6.4): schneller vollständiger Abbau.

Die Abspaltung von ca. 2 kDa vom "Core"-Protein II war so schnell, daß sie auch in der sofort nach Proteaseinkubation gestoppten Kontrolle stattfand. Die proteolytischen Fragmente selbst

waren gegenüber weiteren Angriffen der Proteasen stabil, d.h. ihre Konzentration nahm auch bei längerer Inkubation nicht ab. Außerdem waren die Fragmente (mit Ausnahme des Eisen-Schwefel-Fragments) noch an den Multiproteinkomplex gebunden, da sie bei Ausfällung des Komplexes durch Entsalzen mittels Dialyse mit dem Komplex präzipitierten. (Abgelöste kleine Untereinheiten würden durch das gebundene Detergens alleine in Lösung gehalten; vgl. S. 82).

Die Spaltung des "Core"-Proteins II und der Untereinheiten VI^(13.4) und XI^(6.4) mit Trypsin führte nicht zu einem Verlust der Ubihydrochinon:Cytochrom c-Reduktase-Aktivität. Die beobachtete Inaktivierung verlief nicht entsprechend der Spaltung dieser drei Untereinheiten, sondern war auf den langsamen Abbau des Eisen-Schwefel-Proteins (ISP) zurückzuführen (vgl. Abb. 44, S. 95) und ließ sich durch Zugabe von isoliertem ISP rekonstituieren; die Cytochromspektren waren unverändert.

Da sich aus den Experimenten wiederholt Hinweise auf die Abhängigkeit des Proteaseabbaus vom Detergens ergaben, wurde der Einfluß verschiedener Detergensenkonzentrationen näher untersucht. Hierbei wurden die Detergentien Triton X-100, Polyoxyethylen (9)-laurylether, N-Methyl-N-nonyl-glucamid (MEGA-9) und Desoxycholsäure (Cholat) eingesetzt. Alle genannten Detergentien führten zu einem zunehmenden Proteaseabbau des bc_1 -Komplexes. Dieser Effekt stieg mit zunehmender Detergensenkonzentration an und war abhängig von der Stärke des eingesetzten Detergens, d.h. der Abbau bei niedrigen Konzentrationen eines Detergens mit niedriger CMC (z.B. Triton X-100) war mit dem Abbau bei höheren Konzentrationen eines Detergens mit höherer CMC (z.B. Cholat) vergleichbar. Für die weiteren Untersuchungen wurde Cholat verwandt, da alle Detergentien qualitativ den gleichen Ef-

fekt zeigten und andere Detergentien als Cholat die Fällung des bc_1 -Komplexes mit Trichloressigsäure ungünstig beeinflussten.

Mit Chymotrypsin, Subtilisin, Thermolysin und Trypsin in Gegenwart von 0.5-1% Cholat wurden folgende proteolytische Spaltungen beobachtet (Abb. 42):

- Die ohne Detergentien auftretenden Spaltungen wurden erheblich beschleunigt, insbesondere die sonst nur sehr langsam ab-

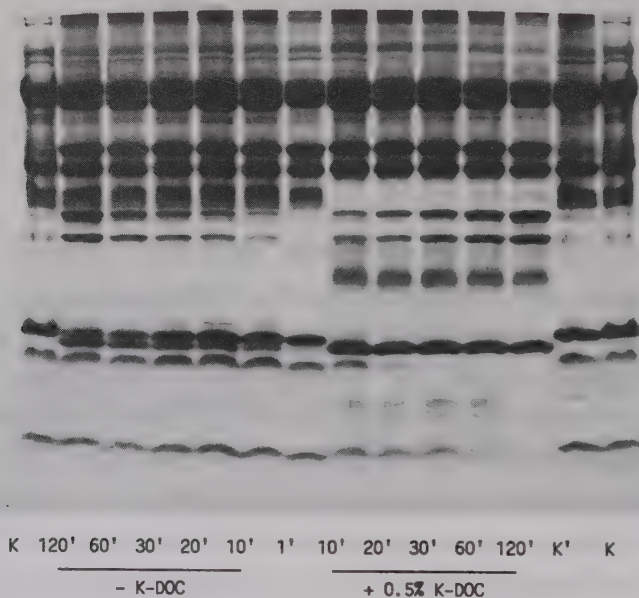


Abb. 42: Proteaseverdau des bc_1 -Komplexes mit Thermolysin mit und ohne zugesetztes Kalium-Desoxycholat (K-DOC). Die Protease-Endkonzentration betrug 0.1 mg/ml. K: Referenz- bc_1 -Komplex; K': bc_1 -Komplex, mit Trichloressigsäure gefällt.

laufende Spaltung des Eisen-Schwefel-Proteins in ein 15 kDa-Fragment;

- die Untereinheiten VII^(9.5) und X^(7.2), die ohne Cholat stabil waren, wurden in Gegenwart von Cholat von allen vier Proteasen vollständig abgebaut;
- das "Core"-Protein I wurde von Subtilisin in zwei Fragmente von ca. 19 und 22 kDa gespalten.

Beide Cytochrome (b und c₁) sowie die Untereinheiten VIII^(9.2) und IX^(8.0) waren gegen Proteasen weitgehend stabil und wurden erst unter Bedingungen gespalten, bei denen der Komplex vollständig zerfiel, z.B. nach mehrstündiger Inkubation mit einer sehr aktiven Protease wie Subtilisin.

Die Untereinheit VII^(9.5) wurde mit Trypsin in Gegenwart von 0.5% Cholat sehr schnell gespalten und war dann nicht mehr nachweisbar. Diese Spaltung führte weder zu einer Veränderung des Cytochrom b-Spektrums, noch zu einem Verlust der Cytochrom c-Reduktase-Aktivität; die beobachtete Inaktivierung war auf die Spaltung des Eisen-Schwefel-Proteins zurückzuführen, die Aktivität konnte mit isoliertem ISP rekonstituiert werden.

Die proteolytische Spaltung des bc₁-Komplexes konnte auch durch Veränderung der Ionenstärke beeinflusst werden. Während Proteasen, die geladene Aminosäuren erkennen, wie z.B. Trypsin, durch höhere Ionenstärken gehemmt wurden, wurden beim Verdau mit Thermolysin, das an hydrophobe Reste bindet, bei höheren Ionenstärken (bis 1 M NaCl oder 500 mM Na₂SO₄) das Eisen-Schwefel-Protein und die Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C") verstärkt abgebaut. Beim Eisen-Schwefel-Protein liegt die Vermutung nahe, daß der Grund die stärkere Dissoziation bei höherer Ionenstärke sein könnte.

Der Verdau von in Proteoliposomen rekonstituiertem bc_1 -Komplex ergab ein sehr ähnliches Abbaumuster wie der Verdau des Komplexes in der Detergens-Micelle, erfolgte aber wesentlich langsamer. Einzig die sehr schnelle Abspaltung von ca. 2 kDa vom "Core"-Protein II, die im solubilisierten Komplex vollständig war bevor das Protein in zwei Fragmente von ca. 18 und 20 kDa gespalten wurde, fand im rekonstituierten Komplex auch bei langer Inkubation nur bei einem Teil der Moleküle statt. Dies zeigt, daß diese Spaltstelle überwiegend vor dem Angriff der Proteasen verborgen und somit im Inneren der Liposomen gelegen sein muß. Da der Komplex in den Proteoliposomen "right-side out", d.h. wie in der inneren Mitochondrienmembran, angeordnet ist, entspricht dies einer Lage auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran.

Abgebaut wurden bei längerer Protease-Inkubation das ISP und die Untereinheiten VI^(13.4) ("QP-C") (teilweise) und XI^(6.4) (vollständig). Da die Orientierung des bc_1 -Komplexes in den Proteoliposomen zwar überwiegend (ca. 90%), aber nicht vollständig "right-side out" ist, läßt sich die Topologie dieser Untereinheiten wegen der veränderten Kinetik der Proteasen aus den Versuchen jedoch nicht zweifelsfrei ableiten.

Eine Bestimmung der N- und C-Termini mittels Aminopeptidase M- oder Carboxypeptidase Y-Verdau war ebenfalls nicht möglich, weil beide Proteasen unter den getesteten Bedingungen keine Veränderung des Bandenmusters im SDS-Polyacrylamidgel bewirkten. Da keine der beiden Proteasen eine Spezifität für bestimmte Spaltstellen besitzt, kann die Ursache für die ausbleibende Spaltung entweder eine Blockierung des N-Terminus (bekannt bei Cytochrom b, Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C") und Untereinheit IX^(8.0)) sein, oder aber bei nicht blockiertem N-Ter-

minus eine Abschirmung beider Enden der Peptidkette innerhalb des Komplexes.

Da die verschiedenen Proteasen trotz unterschiedlicher Spezifität (Chymotrypsin: aromatische Reste; Subtilisin: neutrale und saure Reste; Thermolysin: hydrophobe Reste; Trypsin: basische Reste) ähnliche oder sogar gleiche Verdauemuster ergeben, liegt der Grund für die beobachtete selektive Spaltung des bc_1 -Komplexes offenbar nicht in einer spezifischen Aminosäuresequenz, sondern in einer bestimmten Topologie der gespaltenen Peptidketten. Diejenigen Bereiche der einzelnen Untereinheiten, die an der Oberfläche liegen, werden von allen Proteasen in ähnlicher Weise gespalten; nur wenn in dem exponierten Bereich eine für die Erkennung durch die jeweils eingesetzte Protease geeignete Aminosäureseitengruppe fehlt, bleibt die Spaltung durch diese Protease aus. Beispiele hierfür sind das "Core"-Protein II, bei dem die schnelle Abspaltung von ca. 2 kDa nicht mit Trypsin erfolgt (keine basischen Reste in der Nähe des N- oder C-Terminus exponiert?), und die Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C"), bei der Chymotrypsin keine Spaltung bewirkt, was auf das Fehlen von aromatischen Resten im exponierten Teil des Proteins hinweist.

Aus der unterschiedlichen Protease-Empfindlichkeit unter verschiedenen Bedingungen lassen sich daher Aussagen über die Wechselwirkung zwischen der Proteinoberfläche und der Umgebung ableiten. Der Effekt von Detergentien oder hoher Ionenstärke besteht offensichtlich darin, die Struktur des Komplexes, besonders an der Oberfläche, zu lockern. Dies bewirkt, daß Teile der Peptidketten, die ohne Detergens verborgen sind oder aber in einer starren Konformation vorliegen, für die Proteasen zugänglich werden.

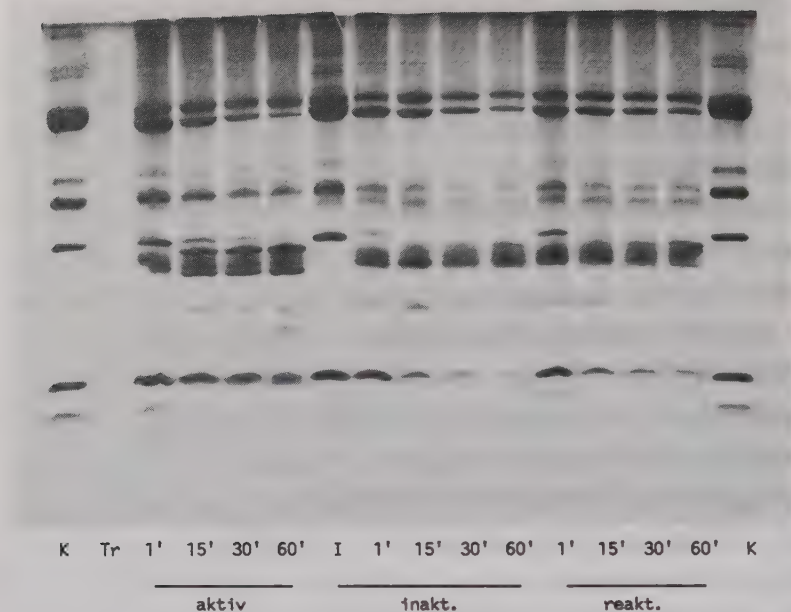


Abb. 43: Proteaseverdau des bc_1 -Komplexes mit Trypsin mit und ohne zugesetztes Ei-Phospholipid (PL). Die Protease-Endkonzentration betrug 0.1 mg/ml. K: Referenz- bc_1 -Komplex; Tr: Trypsin; aktiv: aktiver bc_1 -Komplex; inakt.: mit Phospholipase A_2 (Sigma, 5 U/nMol c_1 , 1^h) inaktiviert (I: ohne Protease); reakt.: mit Ei-Phospholipid (75 μ g/nMol c_1) reaktiviert.

Im Gegensatz dazu bewirken Phospholipide eine Stabilisierung des bc_1 -Komplexes, wie die Experimente mit dem rekonstituierten Komplex zeigten. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Trypsin-Spaltungsmuster von isoliertem, Phospholipid-haltigem und von durch Phospholipase A_2 -Behandlung Phospholipid-abgereichertem

bc_1 -Komplex miteinander verglichen (Abb. 43). Es zeigte sich, daß die Abspaltung von Phospholipiden die Proteolyseempfindlichkeit des Komplexes steigerte. Da einerseits die Zugänglichkeit des Komplexes gegenüber den Proteasen durch die Entfernung der gebundenen Phospholipidmonolayer nicht wesentlich beeinflusst werden sollte (es sei denn, daß Spaltstellen freigelegt würden, die sonst direkt durch das gebundene Phospholipid bedeckt werden), und andererseits bekannt ist, daß die Konformation des bc_1 -Komplexes durch Entfernung des gebundenen Phospholipids verändert wird (Salerno et al., 1986), bedeutet dies für die Experimente in den Liposomen, daß die Struktur des bc_1 -Komplexes selbst stabilisiert ist und daß die verringerte Empfindlichkeit gegenüber Proteasen nicht oder nicht ausschließlich darauf zurückzuführen ist, daß die Membran die Angriffsstellen der Proteasen verdeckt.

3.5 Isolierung eines löslichen Eisen-Schwefel-Protein-Fragments

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, daß die proteolytische Inaktivierung des bc_1 -Komplexes zuerst auf einer Spaltung des "Rieske"-Eisen-Schwefel-Proteins in ein Eisen-Schwefel-Protein-Fragment von ca. 15 kDa beruht. Es wurde daher versucht, dieses Fragment zu isolieren, durch Aminosäuresequenzierung die Spaltstelle zu bestimmen und die Eigenschaften dieses Fragmentes zu charakterisieren.

3.5.1 Methoden

500-1000 nMol isolierter bc_1 -Komplex wurde in 100 mM NaCl, 20 mM Mops, 0.1% TX-100, pH 7.2, unter Zusatz von 5 mM $CaCl_2$ und 0.2% Kalium-Desoxycholat mit 1% Thermolysin (w/w, bezogen auf den bc_1 -Komplex) bei Raumtemperatur so lange inkubiert, bis keine Ubihydrochinon:Cytochrom c-Reduktase-Aktivität mehr meßbar war (Abb. 44). Dann wurde die Protease durch Zugabe von 5% (v/v) EDTA-Lösung, pH 7.2, gehemmt und der Komplex durch Dialyse gegen 10 mM NaCl, 10 mM Mops, 5 mM EDTA, pH 7.2, ausgefällt. Der ausgefällte Komplex wurde durch Ultrazentrifugation abgetrennt, der Überstand durch Druckfiltration mit einer Membran Amicon YM-5 auf ca. 2 ml eingengt und auf eine Gelfiltrationssäule Sephadex G-50 sf (Pharmacia) aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen wurden spektroskopisch und mittels SDS- {Natriumlaurylsulfat-} Gelelektrophorese überprüft, und die Eisen-Schwefel-Fragment-haltigen Fraktionen zur Aufbewahrung ohne weitere Behandlung eingefroren.

3.5.2 Ergebnisse

Die Isolierungsvorschrift basiert auf der Beobachtung, daß das 15 kDa-Fragment des Eisen-Schwefel-Proteins (im Folgenden Eisen-Schwefel-Fragment oder ISF genannt) vollständig wasserlös-

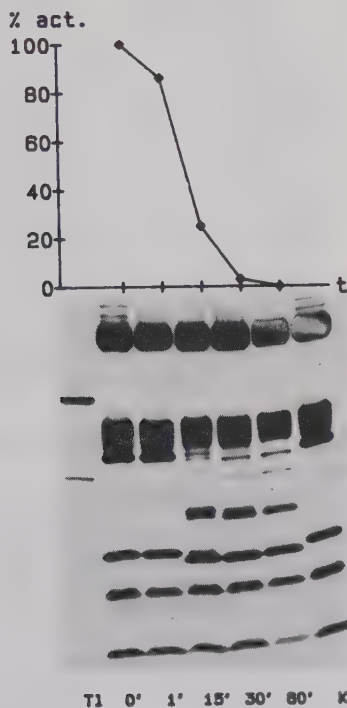


Abb. 44: Proteaseverdau des Rinderherz-bc₁-Komplexes mit Thermolysin in Gegenwart von 0.2% Desoxycholat. Oben: Aktivität (Referenz = 100%); unten: SDS-PAGE. K: Referenzkomplex; Tl: Thermolysin; 0': Vor Zugabe von Thermolysin; 1', 15', 30', 60': Protease nach definierter Zeit mit 5 mM EDTA gehemmt und Aktivität bestimmt bzw. für SDS-Gel gefällt (s. Methoden).

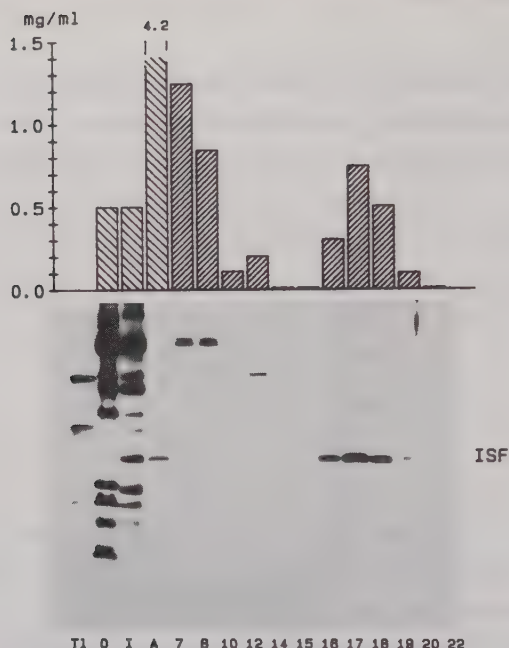


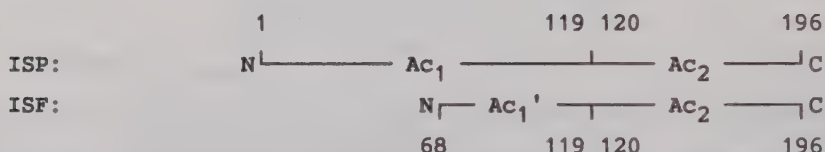
Abb. 45: Isolierung des ISF: Elutionsprofil der Gelsäule (Sephadex G-50 sf).

Oben: Proteinbestimmung nach Lowry; unten: SDS-PAGE, 0: Komplex vor Verdau; I: Komplex nach Verdau (1^h); A: Auftrag Gelsäule nach Dialyse, Zentrifugation und Druckfiltration; 7 - 22: Säulenfraktionen. Das ISF ist in den Fraktionen 16 - 19 enthalten.

lich und nicht mehr an den Komplex gebunden ist. Die Zugabe von 5 mM EDTA hemmt die Protease, hat jedoch keinen Einfluß auf das Fe_2S_2 -Zentrum. Bei der Gelfiltration erscheint der restliche, nicht ausgefallene bc_1 -Komplex im Ausschlußvolumen, wäh-

Elektronen, die im isolierten und teilweise reduzierten bc_1 -Komplex noch vorhanden sind, im Eisen-Schwefel-Zentrum als positiver Redoxkomponente gespeichert.

Die Länge des Fragments wurde durch proteolytische Kartierung näher eingegrenzt. Das ISP weist eine acidolytische Spaltstelle (Asp_{119} - Pro_{120}) auf. Der Vergleich der acidolytischen Spaltstücke des ISF und des ISP mittels SDS-Gelelektrophorese (Abb. 47) zeigte, daß die C-terminalen Fragmente (Ac_2) identisch waren (77 Reste). Das N-terminale acidolytische Spaltstück des ISF (Ac_1') war jedoch nur etwa halb so groß wie das N-terminale Fragment des ISP (Ac_1 , 119 Reste). Daher mußte die Thermolysin-Spaltstelle im N-terminalen Bereich des ISP etwa bei Position 60 liegen.



Die Ansequenzierung des Fragments [Handabbau mittels der DABITC-PITC-Doppelkopplungsmethode und Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nach Chang et al. (1978) oder Flüssigphasensequenzierung nach Mewes (1987)] ergab die N-terminale Sequenz Val-Leu-Ala. Dies entspricht der Sequenz ab Position 68 des ISP (Schägger et al., 1987). Die Übereinstimmung zwischen der Aminosäureanalyse des ISF und der aus der Sequenz berechneten ist befriedigend (Tabelle 6).

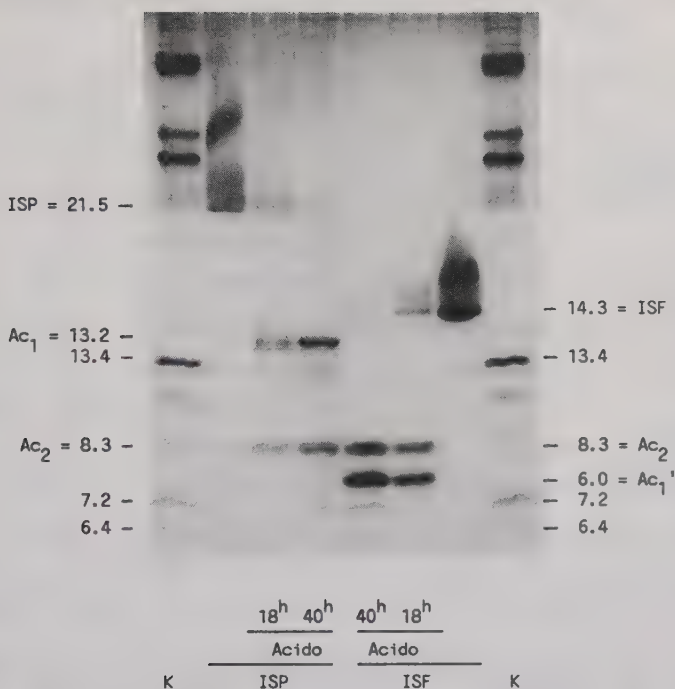


Abb. 47: Vergleich der acidolytischen Spaltungsmuster des isolierten Eisen-Schwefel-Proteins (ISP) und des Eisen-Schwefel-Protein-Fragments (ISF).

Die acidolytische Spaltung erfolgte 18^h bzw. 40^h in 80% Ameisensäure bei 40°C. Die Massen einiger Banden in kDa sind angegeben. Als Referenz ist der Rinderherz-bc₁-Komplex (K) aufgetragen.

Das isolierte ISF ließ sich weder mit dem Restkomplex, der bei der proteolytischen Spaltung entsteht, noch mit einem nach Engel et al. (1983a) isolierten, ISP-freien, aber sonst (bis auf die Untereinheit XI^(6,4)) intakten, bc₁-Restkomplex rekonstituieren.

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung des wasserlöslichen Fragments des Eisen-Schwefel-Proteins.

	Analyse	Berechnet
Asparaginsäure + Asparagin	11.2	10
Glutaminsäure + Glutamin	14.8	12
Serin	6.3	6
Glycin	12.6	12
Threonin	2.8	3
Histidin	4.3	5
Alanin	7.9	9
Arginin	7.1	7
Tyrosin	3.7	4
Valin	10.0	11
Methionin	2.3	3
Isoleucin	8.6	9
Phenylalanin	3.7	4
Leucin	9.0	9
Lysin	9.9	10

Das wasserlösliche ISF unterscheidet sich vom vollständigen ISP, das zur Solubilisierung Detergens benötigt, durch das Fehlen des hydrophoben Ankers, der für die Bindung im Holokomplex essentiell ist. Es bleibt jedoch offen, ob der N-terminale Bereich des ISP außer seiner Funktion als hydrophober Membrananker noch weitere spezifische Funktionen erfüllt, z.B. eine direkte Beteiligung an der Chinonbindung.

Die Experimente bestätigten unsere Strukturvorhersage des ISP, da die beobachtete Spaltstelle am Ende des vorhergesagten hydrophoben, Haarnadel-förmigen Membranankers liegt (vgl. Abb. 21, S. 35).

4. Diskussion

Eine Zusammenfassung der Vorhersagen der Membran-überspannenden Bereiche des Rinderherz-bc₁-Komplexes zeigt, daß alle kleinen Untereinheiten transmembrane Sequenzen enthalten oder über amphipathische Domänen verfügen, die zur Bindung an den Kern des Komplexes dienen können (Tabelle 7).

Am Beispiel der Untereinheit VII^(9.5) des bc₁-Komplexes aus Rinderherz soll im Folgenden gezeigt werden, wie die Strukturvorhersagen durch den Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen überprüft werden können:

In der "sided"-Hydropathie-Darstellung sind neben dem hydrophoben Segment, das eine mögliche transmembrane α -Helix darstellt, längere Bereiche zu erkennen, die auf amphipathische Helices deuten (Abb. 48). Ähnliche amphipathische Bereiche sind auch in der homologen Untereinheit VIII^(12.3) des Hefe-Komplexes zu erkennen (s. Anhang IV). Die Strukturvorhersage der Untereinheit VII^(9.5) deutet also auf eine Lage im hydrophoben Inneren des Komplexes und auf eine Bindung an andere Untereinheiten durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die Vorhersage wird dadurch bestätigt, daß die Untereinheit im nativen Komplex von Proteasen nicht angegriffen wird, und keine IgG bindet; durch die Wirkung von Detergentien wird sie dagegen für Proteasen zugänglich. Ein weiterer Hinweis auf die hydrophoben Eigenschaften ist, daß die Untereinheit nach Dissoziation selbst in Gegenwart von 0.1% Triton X-100 aggregiert, obwohl sie einen höheren Polaritätsindex aufweist als z.B. die Untereinheit IX^(8.0), die sogar ohne zugesetztes Detergens in Lösung bleibt (s. Anhang II).

Tabelle 7: Vorhersage der möglichen Membrananker der Untereinheiten des bc₁-Komplexes aus Rinderherz.

Cytochrom b	I	30	-	52	a
	II	78	-	105	h
	III	112	-	134	h
	IV	143	-	166	A°
	V	178	-	202	a
	VI	229	-	250	H
	VII	286	-	307	H
	VIII	320	-	339	a
	IX	347	-	370	H
Cytochrom c ₁		206	-	222	H
ISP		34	-	51	a
		54	-	72	a
VI ^(13.4)		1	-	16	A°
VII ^(9.5)		41	-	63	h
VIII ^(9.2)		13	-	33	A°
		58	-	77	A°
IX ^(8.0)		10	-	35	a
X ^(7.2)		20	-	43	h
XI ^(6.4)		12	-	36	H

Zuordnung: H: stark hydrophob; h: hydrophob; a: amphipathisch; A: stark amphipathisch. °: Diese stark amphipathischen Helices könnten entweder in der Membran oder zwischen hydrophoben und hydrophilen Bereichen des Komplexes gelegen sein.

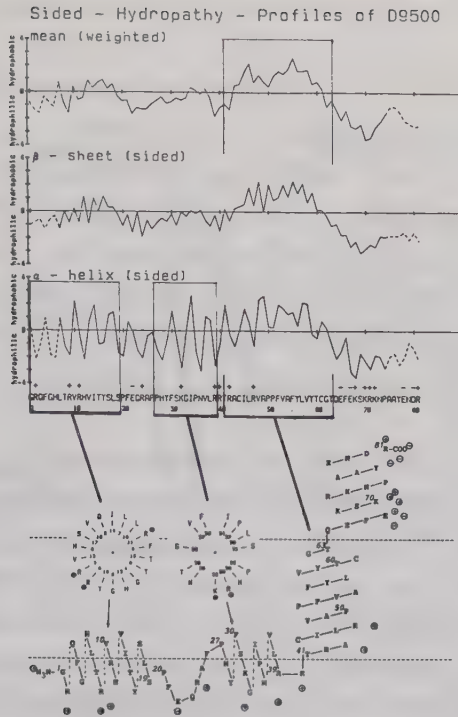


Abb. 48: Strukturvorhersage mittels des "sided"-Hydropathie-Plots am Beispiel der Untereinheit VII^(9.5) des bc₁-Komplexes aus Rinderherz.

Aus den oben dargestellten Ergebnissen lassen sich auf entsprechende Weise Aussagen zur Struktur aller Untereinheiten des Rinderherz-bc₁-Komplexes erhalten (vgl. Abb. 49):

- Alle Untereinheiten außer Cytochrom b und der Untereinheit VII^(9.5) (Untereinheit IX^(8.0) fraglich) haben Domänen an

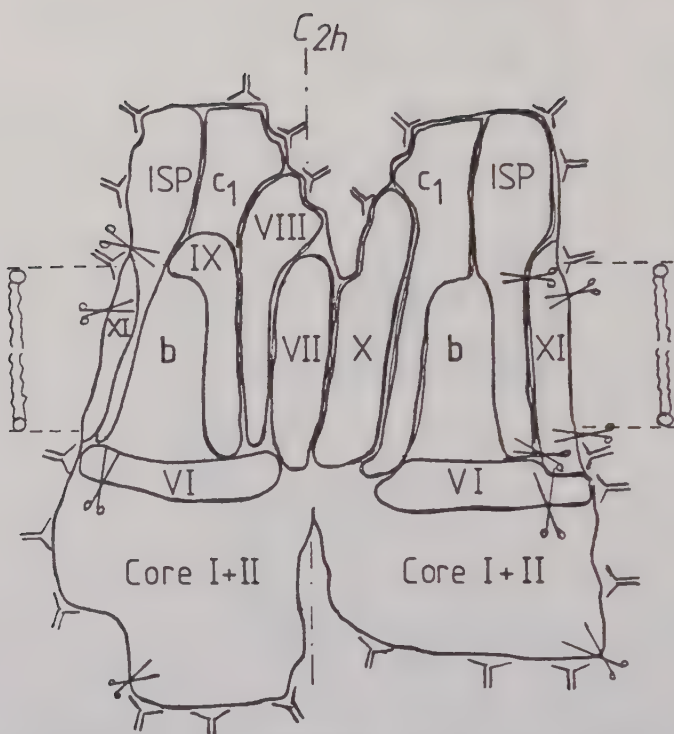


Abb. 49: Zusammenfassung der Ergebnisse der Strukturvorhersagen sowie der immunologischen, Dissoziations- und Protease-Experimente am Bild des bc_1 -Komplexes. Dem Modell liegt die niedrig-aufgelöste 3D-Struktur des bc_1 -Komplexes aus *Neurospora crassa* zugrunde (Leonard et al., 1981). Aufgrund der C_{2h} -Symmetrie zeigt die eine Hälfte des Dimeren die "Vorderseite", die andere die "Rückseite", so daß jeweils andere, an das Cytochrom b im Kern des Komplexes gebundene Untereinheiten sichtbar sind. "Oben" entspricht der cytosolischen Seite der inneren Mitochondrienmembran, "unten" der Matrixseite. Die gezeichneten IgG zeigen, welche Untereinheiten im nativen Komplex mit IgG reagieren; die Scheren symbolisieren Protease-Spaltstellen.

der Oberfläche des Komplexes exponiert, die Antikörper binden können.

- Alle Untereinheiten (mit Ausnahme der Untereinheit IX^(8.0)) benötigen zur Dissoziation von dem Multiproteinkomplex und für ihre Solubilisierung Detergentien, sind also nicht wasserlöslich. Die Wasserlöslichkeit der Untereinheit IX^(8.0) ist bemerkenswert, da diese Untereinheit die geringste Polarität aller kleinen Untereinheiten besitzt (Anhang II).
- Cytochrom b bildet den Kern des Komplexes und ist im intakten Komplex weder für Proteasen noch für Antikörper zugänglich.
- Die einzigen Untereinheiten, die ohne Anwendung chaotroper Agentien abdissoziiert und anschließend rekonstituiert werden können, sind das Eisen-Schwefel-Protein und die Untereinheit XI^(6.4). Die Strukturvorhersagen zeigen, daß dies die einzigen beiden Untereinheiten sind, die keine geladenen Aminosäuren in ihren Membranankern enthalten und daher keine Ionenpaarbindungen in hydrophoben Bereichen ausbilden können. Beide Untereinheiten sind jedoch so fest im Komplex verankert, daß die Antikörper, die an ihrer Oberfläche gebunden waren, bei der Präzipitation des Komplexes mit ausgefällt wurden.
- Der Versuch der Dissoziation einer der anderen neun Untereinheiten führte zu einer partiellen Denaturierung des Cytochrom b.

Das Cytochrom b im intakten bc₁-Komplex liegt in einem sterisch gespannten Zustand vor ("steric strain"), der für die Funktion der Hämzentren wesentlich ist. Die sterische Spannung ist verantwortlich für die beobachteten, für b-Typ-Cytochrome hohen Redoxpotentiale (+50 mV und -50 mV), für

die langwelligen Absorptionsbanden (566 und 562 nm) und für die hohen g_z -Werte im ESR-Spektrum ($g_z = 3.78$ und 3.44). Im Gegensatz dazu weist das isolierte, entspannte Cytochrom b Redoxpotentiale von +10 und -100 mV, nur ein Absorptionsmaximum bei 560 nm und einen g_z -Wert von 2.93 auf (von Jagow et al., 1978a,b; G. von Jagow & S. Albracht, unveröffentlicht).

Hohe g -Werte werden in sterisch stark gespannten Häm-Modellsystemen beobachtet, wenn die Ebenen der beiden Histidine, die die fünften und sechsten Liganden bilden, nicht parallel angeordnet sind, sondern einen Winkel von fast 90° miteinander bilden (Palmer, 1985). Eine vergleichbare Situation wird im Cytochrom b-559 aus dem Photosystem II beobachtet, das entweder in einer "high potential"-Form mit hohem Redoxpotential ($E_m \approx +400$ mV) und einem g_z -Wert von 3.08, oder aber in einer "low-potential"-Form mit einem g_z -Wert von 2.94 und einem Redoxpotential von ≈ 0 mV vorliegen kann; zwischen den beiden Zuständen ist ein reversibler Übergang möglich (Babcock et al., 1985).

Im Cytochrom b des bc_1 -Komplexes führte die Entspannung des "steric strain" zu einem Zustand, der dem des isolierten Proteins entsprach; der Übergang war unter den Versuchsbedingungen irreversibel.

- Die Veränderung der Struktur des Cytochrom b fand bei der Abspaltung von drei der kleinen Untereinheiten ($VI^{(13.4)}$, $VII^{(9.5)}$ und $IX^{(8.0)}$) statt, von denen nur die Untereinheit $VII^{(9.5)}$ eine ausgeprägte hydrophobe Domäne, alle drei aber vorhergesagte amphipathische Bereiche enthalten.

Da der vollständige Abbau der Untereinheit $VII^{(9.5)}$ mit Trypsin zu keiner Veränderung des Cytochrom b-Spektrums führte

und sich die Ubihydrochinon:Cytochrom c-Reduktase-Aktivität danach mit isoliertem Eisen-Schwefel-Protein rekonstituieren ließ, scheint die Untereinheit VII^(9.5) nicht an der Aufrechterhaltung des "steric strain" des Cytochrom b beteiligt zu sein.

- Diese drei kleinen Untereinheiten, deren Ablösung mit der partiellen Denaturierung des Cytochrom b verbunden ist, zeigten folgendes Verhalten gegenüber Proteasen und Antikörpern: Von der Untereinheit VI^(13.4) wurde nur ein kurzes (ca. 1 kDa) Stück an einem Ende abgespalten und sie reagierte im intakten Komplex nur mit einem geringen Teil der IgG; die Untereinheit VII^(9.5) wurde ohne zugesetztes Detergens nicht, in Gegenwart von Detergens aber schnell vollständig abgebaut und band keine IgG; die Untereinheit IX^(8.0) wurde von Proteasen nicht angegriffen, und gegen sie waren keine IgG nachweisbar.

Diese Ergebnisse zeigen, daß alle drei Untereinheiten im Inneren des intakten Komplexes verborgen sind. Nur von der Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C") ist ein kurzes Stück an einem Ende der Peptidkette exponiert, das sowohl für Proteasen als auch für Antikörper zugänglich ist; das nach der Abspaltung dieses terminalen Endes entstandene Proteinfragment blieb an den Komplex gebunden und reagierte unter nicht-denaturierenden Bedingungen nicht mehr mit Antikörpern.

- Die Untereinheiten VIII^(9.2) und X^(7.2) waren fest an das Cytochrom c₁ gebunden; sie bilden mit diesem den "Cytochrom c₁-Subkomplex" (Schägger et al., 1986). Beide Untereinheiten zeigten ähnliche Eigenschaften wie das Cytochrom c₁, d.h. sie wurden von Proteasen fast nicht angegriffen (nur die Untereinheit X^(7.2) im Detergens-behandelten Komplex), rea-

gierten aber im intakten Komplex stark mit Antikörpern, ohne daß die Enzymaktivität hierdurch gehemmt wurde.

- Die starke Detergensabhängigkeit der Reaktion der Untereinheiten VII^(9.5) und X^(7.2) zeigte, daß in Übereinstimmung mit den Strukturvorhersagen bei diesen beiden Untereinheiten ebenso wie bei der Untereinheit XI^(6.4) überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Untereinheiten für die Bindung im Komplex verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu scheinen bei den Untereinheiten VI^(13.4) ("QP-C"), VIII^(9.2) und IX^(8.0) polare bzw. amphipathische Domänen das Verhalten der Untereinheiten zu bestimmen.

5. Zusammenfassung

Eine neue graphische Methode zur Analyse der Strukturen von Membranproteinen wurde entwickelt, die insbesondere die Identifikation amphipathischer Strukturen erlaubt ("sided"-Hydropathie-Plot). Die Anwendung dieser Methode sowie der Vergleich der Sequenzen der Untereinheiten des bc_1 -Komplexes aus Rinderherz-mitochondrien mit den bekannten Untereinheiten des bc_1 -Komplexes aus Hefe ermöglichte die Vorhersage der Struktur des Rinderherz- bc_1 -Komplexes. Die Strukturvorhersagen wurden dann durch Vergleich mit den Ergebnissen von Protease-, Dissoziations- und immunologischen Experimenten überprüft.

Zusammenfassend läßt sich die so abgeleitete Struktur des mitochondrialen bc_1 -Komplexes wie folgt beschreiben:

Der Kern des gesamten Multiproteinkomplexes wird vom Cytochrom b gebildet. Dieses enthält ein "4- α -helicales-Bündel" als zentrales Strukturmotiv, innerhalb dessen die beiden Hämzentren in einer transmembranen Anordnung liegen. Die Umgebung der Hämzentren befindet sich in einer stark gespannten Konformation ("steric strain"), die durch gebundene kleine amphipathische Untereinheiten ($VI^{(13.4)}$, $IX^{(8.0)}$) stabilisiert wird.

An diesen Kern sind auf der Außenseite des Komplexes zwei hydrophile, elektronenübertragende Proteine gebunden, das Eisen-Schwefel-Protein und das Cytochrom c_1 , die mit ihren Redoxzentren zur Membran orientiert und jeweils durch transmembrane Segmente in der Membran verankert sind. Die beiden Chinonreaktionszentren, von denen das eine (Q_O -Zentrum) in der Nähe der Membranoberfläche und das andere (Q_I -Zentrum) mehr zur Mitte der Membran hin angeordnet ist, werden einerseits von Teilen des Cytochrom b, andererseits von amphipathischen Domä-

nen anderer Proteine, wie des Eisen-Schwefel-Proteins oder der Untereinheit VI^(13.4) ("QP-C"), gebildet.

Der Hauptteil der Proteinmasse des bc₁-Komplexes erstreckt sich außerhalb der Membran in den mitochondrialen Matrixraum. Bis auf die Untereinheit XI^(6.4), die nur hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden kann, sind die Untereinheiten durch elektrostatische Wechselwirkungen amphipathischer Bereiche (Untereinheiten VI^(13.4) ("QP-C"), VIII^(9.2) und IX^(8.0)) oder einzelner polarer Aminosäuren in hydrophoben Domänen (Untereinheiten VII^(9.5) und X^(7.2)) fest aneinander und an den Kern des Komplexes gebunden.

6. Literaturverzeichnis

- Anderson, S., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. & Young, I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA - conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156, 683-717.
- Aquila, H., Link, T.A. & Klingenberg, M. (1985) The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* 4, 2369-2376.
- Aquila, H., Link, T.A. & Klingenberg, M. (1987) Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS Lett.* 212, 1-9.
- Babcock, G.T., Widger, W.R., Cramer, W.A., Oertling, W.A. & Metz, J.G. (1985) Axial ligands of chloroplast cytochrome b-559: Identification and requirement for a heme-cross-linked polypeptide structure. *Biochemistry* 24, 3638-3645.
- Beckmann, J.D., Ljungdahl, P.O., Lopez, J.L. & Trumpower, B.L. (1987) Isolation and characterization of the nuclear gene encoding the Rieske iron-sulfur protein (RIP1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262, 8901-8909.
- Berry, E.A. & Trumpower, B.L. (1985) Pathways of electrons and protons through the cytochrome bc₁ complex of the mitochondrial respiratory chain. In *Coenzyme Q* (Lenaz, G., ed.), pp. 365-389, John Wiley & Sons Ltd., New York.
- Bode, C., Goebell, H. & Stähler, E. (1968) Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuret-methode. *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.* 6, 418-422.
- Borchart, U., Machleidt, W., Schägger, H., Link, T.A. & von Jagow, G. (1985) Isolation and amino acid sequence of the 8 kDa DCCD-binding protein of beef heart ubiquinol:cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* 191, 125-130.
- Borchart, U., Machleidt, W., Schägger, H., Link, T.A. & von Jagow, G. (1986) Isolation and amino acid sequence of the 9.5 kDa protein of beef heart ubiquinol:cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* 200, 81-86.

- Brandt, U., Schagger, H. & von Jagow, G. (1988) Characterisation of binding of the methoxyacrylate (MOA) inhibitors to mitochondrial cytochrome c reductase. *Eur. J. Biochem.* 173, 499-506.
- Carter, K.R., T'sai, A.-I. & Palmer, G. (1981) The coordination environment of mitochondrial cytochromes b. *FEBS Lett.* 132, 243-246.
- Chang, J.Y., Brauer, D. & Wittmann-Liebold, B. (1978) Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.* 93, 205-214.
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1974) Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13, 211-222.
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45-148.
- Cline, J.F., Hoffman, B.M., Mims, W.B., LaHaie, E., Ballou, D.P. & Fee, J.A. (1985) Evidence for N coordination to Fe in the [2Fe-2S] clusters of *Thermus* Rieske protein and phthalate dioxygenase from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 260, 3251-3254.
- Crofts, A.R. (1985) The mechanism of the ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase of mitochondria and of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. In *The enzymes of biological membranes*, Vol. 4 (Martonosi, A.N., ed.), 2. ed., pp. 347-382, Plenum Press, New York/London.
- Crofts, A.R., Robinson, H., Andrews, K., van Doren, S. & Berry, E. (1987) Catalytic sites for reduction and oxidation of quinones. In *Cytochrome systems: Molecular biology and bioenergetics* (Papa, S., Chance, B. & Ernster, L., eds.), pp. 617-624, Plenum Press, New York/London.
- Davis, T.N., Urdea, M.S., Masiarz, F.R. & Thorner, J. (1986) Isolation of the yeast calmodulin gene: Calmodulin is an essential protein. *Cell* 47, 423-431.
- de Blas, A.L. & Cherwinski, H.M. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 133, 214-219.

- De Haan, M., van Loon, A.P.G.M., Kreike, J., Vaessen, R.T.M.J. & Grivell, L.A. (1984) The biosynthesis of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex in yeast. *Eur. J. Biochem.* 138, 169-177.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 318, 618-624.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179, 125-142.
- Engel, W.D., Michalski, C. & von Jagow, G. (1983a) Reconstitution of the ubiquinol:cytochrome c reductase from a bc₁ sub-complex and the 'Rieske' iron-sulfur protein isolated by a new method. *Eur. J. Biochem.* 132, 395-402.
- Engel, W.D., Schagger, H. & von Jagow, G. (1983b) Isolation of complex III from various mitochondria. Comparison of the structural and functional properties of the preparations from beef heart, calf liver and *Neurospora crassa*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 1753-1763.
- Engelman, D.M. (1982) An implication of the structure of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 37, 187-188.
- Engelman, D.M. & Zaccai, G. (1980) Bacteriorhodopsin is an inside-out protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5894-5898.
- Fee, J.A., Findling, K.L., Yoshida, T., Hille, R., Tarr, G.E., Hearshen, D.O., Dunham, W.R., Day, E.P., Kent, T.A. & Münck, E. (1984) Purification and characterization of the Rieske iron-sulfur protein from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 259, 124-133.
- Fukuyama, K., Hase, T., Matsumoto, S., Tsukihara, T., Katsube, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Wada, K. & Matsubara, H. (1980) Structure of *S. platensis* [2Fe-2S]ferredoxin and evolution of chloroplast-type ferredoxins. *Nature* 286, 522-523.
- Gabellini, N. & Sebald, W. (1986) Nucleotide sequence and transcription of the fbc operon from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.* 154, 569-579.

- Garnier, J., Osguthorpe, D.J. & Robson, B. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.
- Harnisch, U., Weiss, H. & Sebald, W. (1985) The primary structure of the iron-sulfur subunit of ubiquinol-cytochrome c reductase from *Neurospora*, determined by cDNA and gene sequencing. *Eur. J. Biochem.* 149, 95-99.
- Hartl, F.-U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. & Neupert, W. (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell* 47, 939-951.
- Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. & Lockau, W. (1983) Comparative aspects of quinol-cytochrome c/plastocyanin oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 726, 97-133.
- Helenius, A. & Simons, K. (1972) The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* 247, 3656-3661.
- Japa, S., Zhu, Q.-s. & Beattie, D.S. (1987) Subunit VII, the ubiquinone-binding protein, of the cytochrome b-c₁ complex of yeast mitochondria is involved in electron transport at center o and faces the matrix side of the membrane. *J. Biol. Chem.* 262, 5441-5444.
- Kadenbach, B., Stroth, A., Ungibauer, M., Kuhn-Nentwig, L., Büge, U. & Jarausch, J. (1986) Isozymes of cytochrome c oxidase. Characterisation and isolation from various tissues. *Methods Enzymol.* 126, 32-45.
- Kagawa, Y. & Racker, E. (1971) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 246, 5477-5487.
- Karlsson, B., Hovmöller, S., Weiss, H. & Leonard, K. (1983) Structural studies of cytochrome reductase: Subunit topography determined by electron microscopy of membrane crystals of a subcomplex. *J. Mol. Biol.* 165, 287-302.
- Kleene, R., Pfanner, N., Pfaller, R., Link, T.A., Sebald, W., Neupert, W. & Tropschug, M. (1987) Mitochondrial porin of *Neurospora crassa*: cDNA cloning, in vitro expression and import into mitochondria. *EMBO J.* 6, 2627-2633.

- Krämer, R. & Klingenberg, M. (1980) Enhancement of reconstituted ADP,ATP exchange activity by phosphatidylethanolamin and by anionic phospholipids. *FEBS Lett.* 119, 257-260.
- Kurowski, B. & Ludwig, B. (1987) The genes of the *Paracoccus denitrificans* bc₁ complex. *J. Biol. Chem.* 262, 13805-13811.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Leonard, K., Wingfield, P., Arad, T. & Weiss, H. (1981) Three-dimensional structure of ubiquinol:cytochrome c reductase from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. *J. Mol. Biol.* 149, 259-274.
- Link, T.A., Schagger, H. & von Jagow, G. (1986) Analysis of the structures of the subunits of the cytochrome bc₁ complex from beef heart mitochondria. *FEBS Lett.* 204, 9-15.
- Link, T.A., Schagger, H. & von Jagow, G. (1987) Structural analysis of the bc₁ complex from beef heart mitochondria by the sided hydropathy plot and by comparison with other bc complexes. In *Cytochrome systems: Molecular biology and bioenergetics* (Papa, S., Chance, B. & Ernster, L., eds.), pp. 289-301, Plenum Press, New York/London.
- Loderbauer, S. (1983) Bestimmung des Molekulargewichtes des mitochondrialen Cytochrom b durch Polyacrylamid-Natrium-Dodecylsulfat-Gelelektrophorese. Dissertation, Ludwig Maximilians-Universität, München.
- Maarse, A.C. & Grivell, L.A. (1987) Nucleotide sequence of the gene encoding the 11kDa subunit of the QH₂-cytochrome c oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 165, 419-425.
- Mendel-Hartvig, I. & Nelson, B.D. (1978) Labeling of complex III peptides in beef heart mitochondria and submitochondrial particles by diazonium benzene [³⁵S]sulfonate. *FEBS Lett.* 92, 36-40.
- Mendel-Hartvig, I. & Nelson, B.D. (1983) Studies on beef heart ubiquinol-cytochrome c reductase. Topological studies on the core proteins using proteolytic digestion and immunoreplica. *J. Bioenerg. Biomembr.* 15, 27-36.
- Mewes, H.W. (1987) Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.

- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Mukai, K., Miyazaki, T., Wakabayashi, S., Kuramitsu, S. & Matsubara, H. (1985) Dissociation of bovine cytochrome c_1 subcomplex and the status of cysteine residues in the subunits. *J. Biochem.* 98, 1417-1425.
- Nobrega, F.G. & Tzagoloff, A. (1980) Assembly of the mitochondrial membrane system. *J. Biol. Chem.* 255, 9828-9837.
- Oudshoorn, P., van Steeg, H., Swinkels, B.W., Schoppink, P. & Grivell, L.A. (1987) Subunit II of yeast QH_2 :cytochrome-c oxidoreductase. Nucleotide sequence of the gene and features of the protein. *Eur. J. Biochem.* 163, 97-103.
- Palmer, G. (1985) The electron paramagnetic resonance of metalloproteins. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 548-560.
- Pfefferkorn, B. & Meyer, H.E. (1986) N-terminal amino acid sequence of the Rieske iron-sulfur protein form the cytochrome b_6/f -complex of spinach thylakoids. *FEBS Lett.* 206, 233-237.
- Rich, P.R. (1984) Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 768, 53-78.
- Sadler, I., Suda, K., Schatz, G., Kaudewitz, F. & Haid, A. (1984) Sequencing of the nuclear gene for the yeast cytochrome c_1 precursor reveals an unusually complex amino-terminal presequence. *EMBO J.* 3, 2137-2143.
- Salerno, J.C., Yoshida, S. & King, T.E. (1986) Effects of protein-protein and protein-lipid interactions on heme site conformation in the mitochondrial b cytochromes. *J. Biol. Chem.* 261, 5480-5486.
- Saraste, M. (1984) Location of haem-binding sites in the mitochondrial cytochrome b. *FEBS Lett.* 166, 367-372.
- Saraste, M. & Walker, J.E. (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* 144, 250-254.
- Schiffer, M. & Edmundson, A.B. (1967) Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7, 121-135.

- Schmitt, M.E. & Trumpower, B.L. (1987) A calmodulin-like protein in the cytochrome bc₁ complex required for synthesis of both cytochrome bc₁ and cytochrome c oxidase complexes in yeast mitochondria. In *Cytochrome systems: Molecular biology and bioenergetics* (Papa, S., Chance, B. & Ernster, L., eds.), pp. 177-187, Plenum Press, New York/London.
- Schwartz, R.M. & Dayhoff, M.O. (1978) Matrices for detecting distant relationships. In *Atlas of protein sequence and structure*, Vol. 5, Suppl. 3 (Dayhoff, M.O., ed.), pp. 353-358, Nat. Biomed. Res. Found., Silver Spring.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Schägger, H., von Jagow, G., Borchart, U. & Machleidt, W. (1983) Amino acid sequence of the smallest protein of the cytochrome c₁ subcomplex from beef heart mitochondria. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 307-311.
- Schägger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, T.A. & von Jagow, G. (1985) Isolation and amino acid sequence of the smallest subunit of beef heart bc₁ complex. *FEBS Lett.* 190, 89-94.
- Schägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. & von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the bc₁ complex from beef heart. *Methods Enzymol.* 126, 224-237.
- Schägger, H., Borchart, U., Machleidt, W., Link, T.A. & von Jagow, G. (1987) Isolation and amino acid sequence of the 'Rieske' iron sulfur protein of beef heart ubiquinol:cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* 219, 161-168.
- Smith, A.L. (1967) Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria: Slaughterhouse material, small-scale. *Methods Enzymol.* X, 81-86.
- Steer, S. (1986) Gewinnung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Untereinheiten des Komplex III aus Rinderherzmitochondrien. Dissertation, Ludwig Maximilians-Universität, München.
- Steppuhn, J., Hermans, J., Jansen, T., Vater, J., Hauska, G. & Herrmann, R.G. (1987) The complete amino-acid sequence of the Rieske FeS-precursor protein from spinach chloroplasts deduced from cDNA analysis. *Mol. Gen. Genet.* 210, 171-177.

- Telser, J., Hoffman, B.M., LoBrutto, R., Ohnishi, T., T'sai, A.-I., Simpkin, D. & Palmer, G. (1987) Evidence for N coordination to Fe in the [2Fe-2S] center in yeast mitochondria complex III. *FEBS Lett.* 214, 117-121.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Trumpower, B.L. & Edwards, C.A. (1979) Identification of oxidation factor as a reconstitutively active form of the iron-sulfur protein of the cytochrome b-c₁ segment of the respiratory chain. *FEBS Lett.* 100, 13-16.
- Tufty, R.M. & Kretsinger, R.H. (1975) Troponin and parvalbumin calcium binding regions predicted in myosin light chain and T4 lysozyme. *Science* 187, 167-169.
- Tzagoloff, A., Wu, M. & Crivellone, M. (1986) Assembly of the mitochondrial membrane system: Characterization of COR1, the structural gene for the 44-kilodalton core protein of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 261, 17163-17169.
- van Loon, A.P.G.M., De Groot, R.J., De Haan, M., Dekker, A. & Grivell, L.A. (1984) The DNA sequence of the nuclear gene coding for the 17-kD subunit VI of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase: a protein with an extremely high content of acidic amino acids. *EMBO J.* 3, 1039-1043.
- Vanderkooi, G. & Capaldi, R.A. (1972) A comparative study of the amino acid compositions of membrane proteins and other proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 195, 135-138.
- von Heijne, G. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membranes correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.* 5, 3021-3027.
- von Jagow, G. & Link, T.A. (1986) Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc₁ complex. *Methods Enzymol.* 126, 253-271.
- von Jagow, G., Schagger, H., Engel, W.D., Hackenberg, H. & Kolb, H.J. (1978a) Beef heart complex III: Isolation and characterization of the heme-b-carrying subunits. In *Energy conservation in biological membranes* (Schäfer, G. & Klingenberg, M., eds.), pp. 43-52, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York.

- von Jagow, G., Schagger, H., Engel, W.D., Machleidt, W., Machleidt, I. & Kolb, H.J. (1978b) Beef heart complex III: Isolation and characterization of cytochrome b. *FEBS Lett.* 91, 121-125.
- von Jagow, G., Link, T.A. & Ohnishi, T. (1986) Organization and function of cytochrome b and ubiquinone in the cristae membrane of beef heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 157-179.
- von Jagow, G., Link, T.A. & Schagger, H. (1987) Structural and functional features of the eleven constituent subunits of the mammalian ubiquinol:cytochrome c reductase. In *Advances in membrane biochemistry and bioenergetics* (Kim, C.H., Tedeschi, H., Diwan, J.J. & Salerno, J.C., eds.), pp. 155-165, Plenum Press, New York/London.
- Wakabayashi, S., Matsubara, H., Kim, C.H., Kawai, K. & King, T.E. (1980) The complete amino acid sequence of bovine heart cytochrome c_1 . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 1548-1554.
- Wakabayashi, S., Takeda, H., Matsubara, H., Kim, C.H. & King, T.E. (1982) Identity of the heme-not-containing protein in bovine heart cytochrome c_1 preparation with the protein mediating c_1 -c complex formation - A protein with high glutamic acid content. *J. Biochem.* 91, 2077-2085.
- Wakabayashi, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Kuramitsu, S., Matsubara, H., Wang, T.-y., Zhang, Z.-p. & King, T.E. (1985) Complete amino acid sequence of the ubiquinone binding protein (QP-C), a protein similar to the 14,000-Dalton subunit of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase complex. *J. Biol. Chem.* 260, 337-343.
- Wallace, B.A., Cascio, M. & Mielke, D.L. (1986) Evaluation of methods for the prediction of membrane protein secondary structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9423-9427.
- Weber, P.C. & Salemme, F.R. (1980) Structural and functional diversity in 4- α -helical proteins. *Nature* 287, 82-84.
- Wells, M.A. & Hanahan, D.J. (1969) Phospholipase A from *Crotalus adamantus* venom. *Methods Enzymol.* XIV, 178-184.

- Widger, W.R., Cramer, W.A., Herrmann, R.G. & Trebst, A. (1984) Sequence homology and structural similarity between cytochrome b of mitochondrial complex III and the chloroplast b_6-f complex: Position of the cytochrome b hemes in the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 674-678.
- Wieland, B., Tomasselli, A.G., Noda, L.H., Frank, R. & Schulz, G.E. (1984) The amino acid sequence of GTP:AMP phosphotransferase from beef-heart mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 143, 331-339.
- Yu, L. & Yu, C.-A. (1982) The interaction of arylazido ubiquinone derivate with mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 257, 10215-10221.

Anhang I: Bekannte Sequenzen der Untereinheiten des bc₁-Komplexes

I. Rinderherz

Cytochrom b (Anderson et al., 1982):

Met-Thr-Asn-Ile-Arg-Lys-Ser-His-Pro-Leu-Met-Lys-Ile-Val-Asn-Asn-Ala-Phe-Ile-Asp-Leu-Pro-Ala-Pro-Ser-Asn-Ile-Ser-Ser-Trp-Trp-Asn-Phe-Gly-Ser-Leu-Leu-Gly-Ile-Cys-Leu-Ile-Leu-Gln-Ile-Leu-Thr-Gly-Leu-Phe-Leu-Ala-Met-His-Tyr-Thr-Ser-Asp-Thr-Thr-Thr-Ala-Phe-Ser-Ser-Val-Thr-His-Ile-Cys-Arg-Asp-Val-Asn-Tyr-Gly-Trp-Ile-Ile-Arg-Tyr-Met-His-Ala-Asn-Gly-Ala-Ser-Met-Phe-Phe-Ile-Cys-Leu-Tyr-Met-His-Val-Gly-Arg-Gly-Leu-Tyr-Tyr-Gly-Ser-Tyr-Thr-Phe-Leu-Glu-Thr-Trp-Asn-Ile-Gly-Val-Ile-Leu-Leu-Leu-Thr-Val-Met-Ala-Thr-Ala-Phe-Met-Gly-Tyr-Val-Leu-Pro-Trp-Gly-Gln-Met-Ser-Phe-Trp-Gly-Ala-Thr-Val-Ile-Thr-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Pro-Tyr-Ile-Gly-Thr-Asn-Leu-Val-Glu-Trp-Ile-Trp-Gly-Gly-Phe-Ser-Val-Asp-Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Arg-Phe-Phe-Ala-Phe-His-Phe-Ile-Leu-Pro-Phe-Ile-Ile-Met-Ala-Ile-Ala-Met-Val-His-Leu-Leu-Phe-Leu-His-Glu-Thr-Gly-Ser-Asn-Asn-Pro-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Asp-Val-Asp-Lys-Ile-Pro-Phe-His-Pro-Tyr-Tyr-Thr-Ile-Lys-Asp-Ile-Leu-Gly-Ala-Leu-Leu-Ile-Leu-Ala-Leu-Met-Leu-Leu-Val-Leu-Phe-Ala-Pro-Asp-Leu-Leu-Gly-Asp-Pro-Asp-Asn-Tyr-Thr-Pro-Ala-Ala-Asn-Pro-Leu-Asn-Thr-Pro-Pro-His-Ile-Lys-Pro-Glu-Trp-Tyr-Phe-Leu-Phe-Ala-Tyr-Ala-Ile-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Asn-Lys-Leu-Gly-Gly-Val-Leu-Ala-Leu-Ala-Phe-Ser-Ile-Leu-Ile-Leu-Ala-Leu-Ile-Pro-Leu-Leu-His-Thr-Ser-Lys-Gln-Arg-Ser-Met-Met-Phe-Arg-Pro-Leu-Ser-Gln-Cys-Leu-Phe-Trp-Ala-Leu-Val-Ala-Asp-Leu-Leu-Thr-Leu-Thr-Trp-Ile-Gly-Gly-Gln-Pro-Val-Glu-His-Pro-Tyr-Ile-Thr-Ile-Gly-Gln-Leu-Ala-Ser-Val-Leu-Tyr-Phe-Leu-Leu-Ile-Leu-Val-Leu-Met-Pro-Thr-Ala-Gly-Thr-Ile-Glu-Asn-Lys-Leu-Leu-Lys-Trp

Cytochrom c₁ (Wakabayashi et al., 1980):

Ser-Asp-Leu-Glu-Leu-His-Pro-Pro-Ser-Tyr-Pro-Trp-Ser-His-Arg-Gly-Leu-Leu-Ser-Ser-Leu-Asp-His-Thr-Ser-Ile-Arg-Arg-Gly-Phe-Gln-Val-Tyr-Lys-Gln-Val-Cys-Ser-Ser-Cys-His-Ser-Met-Asp-Tyr-Val-Ala-Tyr-Arg-His-Leu-Val-Gly-Val-Cys-Tyr-Thr-Glu-Asp-Glu-Ala-Lys-Ala-Leu-Ala-Glu-Glu-Val-Glu-Val-Gln-Asp-Gly-Pro-Asn-Glu-Asp-Gly-Glu-Met-Phe-Met-Arg-Pro-Gly-Lys-Leu-Ser-Asp-Tyr-Phe-Pro-Lys-Pro-Tyr-Pro-Asn-Pro-Glu-Ala-Ala-Arg-Ala-Ala-Asn-Asn-Gly-Ala-Leu-Pro-Pro-Asp-Leu-Ser-Tyr-Ile-Val-Arg-Ala-Arg-His-Gly-Gly-Glu-Asp-Tyr-Val-Phe-Ser-Leu-Leu-Thr-Gly-Tyr-Cys-Glu-Pro-Pro-Thr-Gly-Val-Ser-Leu-Arg-Glu-Gly-Leu-Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Phe-Pro-Gly-Gln-Ala-Ile-Gly-Met-Ala-Pro-Pro-Ile-Tyr-Asn-Glu-Val-Leu-Glu-Phe-Asp-Asp-Gly-Thr-Pro-Ala-Thr-Met-Ser-Gln-Val-Ala-Lys-Asp-Val-Cys-Thr-Phe-Leu-Arg-Trp-Ala-Ala-Glu-Pro-Glu-His-Asp-His-Arg-Lys-Arg-Met-Gly-Leu-Lys-Met-Leu-Leu-Met-Met-Gly-Leu-Leu-Leu-Pro-Leu-Val-Tyr-Ala-Met-Lys-Arg-His-Lys-Trp-Ser-Val-Leu-Lys-Ser-Arg-Lys-Leu-Ala-Tyr-Arg-Pro-Pro-Lys

Eisen-Schwefel-Protein (Schägger et al., 1987):

Ser-His-Thr-Asp-Ile-Lys-Val-Pro-Asp-Phe-Ser-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Glu-Val-Leu-Asp-Ser-Thr-Lys-Ser-Ser-Lys-Glu-Ser-Ser-Glu-Ala-Arg-Lys-Gly-Phe-Ser-Tyr-Leu-Val-Thr-Ala-Thr-Thr-Thr-Val-Gly-Val-Ala-Tyr-Ala-Ala-Lys-Asn-Val-Val-Ser-Gln-Phe-Val-Ser-Ser-Met-Ser-Ala-Ser-Ala-Asp-Val-Leu-Ala-Met-Ala-Lys-Ile-Glu-Ile-Lys-Leu-Ser-Asp-Ile-Pro-Glu-Gly-Lys-Asn-Met-Ala-Phe-Lys-Trp-Arg-Gly-Lys-Pro-Leu-Phe-Val-Arg-His-Arg-Thr-Lys-Lys-Glu-Ile-Asp-Gln-Glu-Ala-Ala-Val-Glu-Val-Ser-Gln-Leu-Arg-Asp-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Glu-Arg-Val-Lys-Lys-Pro-Glu-Trp-Val-Ile-Leu-Ile-Gly-Val-Cys-Thr-His-Leu-Gly-Cys-Val-Pro-Ile-Ala-Asn-Ala-Gly-Asp-Phe-Gly-Gly-Tyr-Tyr-Cys-Pro-Cys-His-Gly-Ser-His-Tyr-Asp-Ala-Ser-Gly-Arg-Ile-Arg-Lys-Gly-Pro-Ala-Pro-Leu-Asn-Leu-Glu-Val-Pro-Ser-Tyr-Glu-Phe-Thr-Ser-Asp-Gly-Met-Val-Ile-Val-Gly

Untereinheit VI^(13.4) (Wakabayashi et al., 1985):

Ala-Gly-Arg-Pro-Ala-Val-Ser-Ala-Ser-Ser-Arg-Trp-Leu-Glu-Gly-Ile-Arg-Lys-Trp-Tyr-Tyr-Asn-Ala-Ala-Gly-Phe-Asn-Lys-Leu-Gly-Leu-Met-Arg-Asp-Asp-Thr-Ile-His-Glu-Asn-Asp-Asp-Val-Lys-Glu-Ala-Ile-Arg-Arg-Leu-Pro-Glu-Asn-Leu-Tyr-Asp-Asp-Arg-Val-Phe-Arg-Ile-Lys-Arg-Ala-Leu-Asp-Leu-Ser-Met-Arg-Gln-Gln-Ile-Leu-Pro-Lys-Glu-Gln-Trp-Thr-Lys-Tyr-Glu-Gl-Asp-Lys-Ser-Tyr-Leu-Glu-Pro-Tyr-Leu-Lys-Glu-Val-Ile-Arg-Glu-Arg-Lys-Glu-Arg-Glu-Glu-Trp-Ala-Lys-Lys

Untereinheit VII^(9.5) (Borchart et al., 1986):

Gly-Arg-Gln-Phe-Gly-His-Leu-Thr-Arg-Val-Arg-His-Val-Ile-Thr-Tyr-Ser-Leu-Ser-Pro-Phe-Glu-Gln-Arg-Ala-Phe-Pro-His-Tyr-Phe-Ser-Lys-Gly-Ile-Pro-Asn-Val-Leu-Arg-Arg-Thr-Arg-Ala-Cys-Ile-Leu-Arg-Val-Ala-Pro-Pro-Phe-Val-Ala-Phe-Tyr-Leu-Val-Tyr-Thr-Cys-Gly-Thr-Gln-Glu-Phe-Glu-Lys-Ser-Lys-Arg-Lys-Asn-Pro-Ala-Ala-Tyr-Glu-Asn-Asp-Arg

Untereinheit VIII^(9.2) (Wakabayashi et al., 1982):

Gly-Asp-Pro-Lys-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Leu-Val-Asp-Pro-Leu-Thr-Thr-Val-Arg-Glu-Gln-Cys-Glu-Gln-Leu-Glu-Lys-Cys-Val-Lys-Ala-Arg-Glu-Arg-Leu-Glu-Leu-Cys-Asp-Glu-Arg-Val-Ser-Ser-Arg-Ser-Gln-Thr-Glu-Glu-Asp-Cys-Thr-Glu-Glu-Leu-Leu-Asp-Phe-Leu-His-Ala-Arg-Asp-His-Cys-Val-Ala-His-Lys-Leu-Phe-Asn-Ser-Leu-Lys

Untereinheit IX^(8.0) (Borchart et al., 1985):

Met-Leu-Ser-Val-Ala-Ala-Arg-Ser-Gly-Pro-Phe-Ala-Pro-Val-Leu-Ser-Ala-Thr-Ser-Arg-Gly-Val-Ala-Gly-Ala-Leu-Arg-Pro-Leu-Val-Gln-Ala-Ala-Val-Pro-Ala-Thr-Ser-Glu-Ser-Pro-Val-Leu-Asp-Leu-Lys-Arg-Ser-Val-Leu-Cys-Arg-Glu-Ser-Leu-Arg-Gly-Gln-Ala-Ala-Gly-Arg-Pro-Leu-Val-Ala-Ser-Val-Ser-Leu-Asn-Val-Pro-Ala-Ser-Val-Arg-Tyr

Untereinheit X^(7.2) (Schägger et al., 1983):

Val-Ala-Pro-Thr-Leu-Thr-Ala-Arg-Leu-Tyr-Ser-Leu-Leu-Phe-Arg-Arg-Thr-Ser-Thr-Phe-Ala-Leu-Thr-Ile-Val-Val-Gly-Ala-Leu-Phe-Phe-Glu-Arg-Ala-Phe-Asp-Gln-Gly-Ala-Asp-Ala-Ile-Tyr-Glu-His-Ile-Asn-Glu-Gly-Lys-Leu-Trp-Lys-His-Ile-Lys-His-Lys-Tyr-Glu-Asn-Lys

Untereinheit XI^(6.4) (Schägger et al., 1985):

Met-Leu-Thr-Arg-Phe-Leu-Gly-Pro-Arg-Tyr-Arg-Gln-Leu-Ala-Arg-Asn-Trp-Val-Pro-Thr-Ala-Gln-Leu-Trp-Gly-Ala-Val-Gly-Ala-Val-Gly-Leu-Val-Ser-Ala-Thr-Asp-Ser-Arg-Leu-Ile-Leu-Asp-Trp-Val-Pro-Tyr-Ile-Asn-Gly-Lys-Phe-Lys-Lys-Asp-Asp

II. Hefe:

"Core"-Protein I (Tzagoloff et al., 1986):

Ser-Leu-Ala-Thr-Ala-Val-Ala-Thr-Pro-Lys-Ala-Glu-Val-Thr-Gln-Leu-Ser-Asn-Gly-Ile-Val-Val-Ala-Thr-Glu-His-Asn-Pro-Ser-Ala-His-Thr-Ala-Ser-Val-Gly-Val-Val-Phe-Gly-Ser-Gly-Ala-Ala-Asn-Glu-Asn-Pro-Tyr-Asn-Asn-Gly-Val-Ser-Asn-Leu-Trp-Lys-Asn-Ile-Phe-Leu-Ser-Lys-Glu-Asn-Ser-Ala-Val-Ala-Ala-Lys-Glu-Gly-Leu-Ala-Leu-Ser-Ser-Asn-Ile-Ser-Arg-Asp-Phe-Gln-Ser-Tyr-Ile-Val-Ser-Ser-Leu-Pro-Gly-Ser-Thr-Asp-Lys-Ser-Leu-Asp-Phe-Leu-Asn-Gln-Ser-Phe-Ile-Gln-Gln-Lys-Ala-Asn-Leu-Leu-Ser-Ser-Ser-Asn-Phe-Glu-Ala-Thr-Lys-Lys-Ser-Val-Leu-Lys-Gln-Val-Gln-Asp-Phe-Glu-Glu-Asn-Asp-His-Pro-Asn-Arg-Val-Leu-Glu-His-Leu-His-Ser-Thr-Ala-Phe-Gln-Asn-Thr-Pro-Leu-Ser-Leu-Pro-Thr-Arg-Gly-Thr-Leu-Glu-Ser-Leu-Glu-Asn-Leu-Val-Val-Ala-Asp-Leu-Glu-Ser-Phe-Ala-Asn-Asn-His-Phe-Leu-Asn-Ser-Asn-Ala-Val-Val-Val-Gly-Thr-Gly-Asn-Ile-Lys-His-Glu-Asp-Leu-Val-Asn-Ser-Ile-Glu-Ser-Lys-Asn-Leu-Ser-Leu-Gln-Thr-Gly-Thr-Lys-Pro-Val-Leu-Lys-Lys-Lys-Ala-Ala-Phe-Leu-Gly-Ser-Glu-Val-Arg-Leu-Arg-Asp-Asp-Thr-Leu-Pro-Lys-Ala-Trp-Ile-Ser-Leu-Ala-Val-Glu-Gly-Glu-Pro-Val-Asn-Ser-Pro-Asn-Tyr-Phe-Val-Ala-Lys-Leu-Ala-Ala-Gln-Ile-Phe-Gly-Ser-Tyr-Asn-Ala-Phe-Glu-Pro-Ala-Ser-Arg-Leu-Gln-Gly-Ile-Lys-Leu-Leu-Leu-His-Ser-Asn-Ile-Gln-Glu-Tyr-Leu-Cys-Asp-Asn-Phe-Asn-His-Phe-Ser-Leu-Ser-Tyr-Lys-Asp-Ser-Gly-Leu-Trp-Gly-Phe-Ser-Thr-Ala-Thr-Arg-Asn-Val-Thr-Met-Ile-Asp-Asp-Leu-Ile-His-Phe-Thr-Leu-Lys-Gln-Trp-Asn-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Val-Thr-Asp-Thr-Glu-Val-Glu-Arg-Ala-Lys-Ser-Leu-Leu-Lys-Leu-Gln-Leu-Gly-Gln-Leu-Tyr-Glu-Ser-Gly-Asn-Pro-Val-Asn-Asp-Ala-Asn-Leu-Leu-Gly-Ala-Glu-Val-Leu-Ile-Lys-Gly-Ser-Lys-Leu-Ser-Leu-Gly-Glu-Ala-Phe-Lys-Lys-Ile-Asp-Ala-Ile-Thr-Val-Lys-Asp-Val-Lys-Ala-Trp-Ala-Gly-Lys-Arg-Leu-Trp-Asp-Gln-Asp-Ile-Ala-Ile-Ala-Gly-Thr-Gly-Gln-Ile-Glu-Gly-Leu-Leu-Asp-Tyr-Met-Arg-Ile-Arg-Ser-Asp-Met-Ser-Met-Met-Arg-Trp

"Core"-Protein II (Oudshoorn et al., 1987):

Leu-Thr-Val-Ser-Ala-Arg-Asp-Ala-Pro-Thr-Lys-Ile-Ser-Thr-Leu-Ala-Val-Lys-Val-His-Gly-Gly-Ser-Arg-Tyr-Ala-Thr-Lys-Asp-Gly-Val-Ala-His-Leu-Leu-Asn-Arg-Phe-Asn-Phe-Gln-Asn-Thr-Asn-Thr-Arg-Ser-Ala-Leu-Lys-Leu-Val-Arg-Glu-Ser-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Thr-Phe-Lys-Ser-Thr-Leu-Asp-Arg-Glu-Tyr-Ile-Thr-Leu-Lys-Ala-Thr-Phe-Leu-Lys-Asp-Asp-Leu-Pro-Tyr-Tyr-Val-Asn-Ala-Leu-Ala-Asp-Val-Leu-Tyr-Lys-Thr-Ala-Phe-Lys-Pro-His-Glu-Leu-Thr-Glu-Ser-Val-Leu-Pro-Ala-Ala-Arg-Tyr-Asp-Tyr-Ala-Val-Ala-Glu-Gln-Cys-Pro-Val-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Gln-Leu-Tyr-Ala-Ile-Thr-Phe-Arg-Lys-Gly-Leu-Gly-Asn-Pro-Leu-Leu-Tyr-Asp-Gly-Val-Glu-Arg-Val-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Lys-Asp-Phe-Ala-Asp-Lys-Val-Tyr-Thr-Lys-Glu-Asn-Leu-Glu-Val-Ser-Gly-Glu-Asn-Val-Val-Glu-Ala-Asp-Leu-Lys-Arg-Phe-Val-Asp-Glu-Ser-Leu-Leu-Ser-Thr-Leu-Pro-Ala-Gly-Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Lys-Ser-Glu-Pro-Lys-Phe-Phe-Leu-Gly-Glu-Glu-Asn-Arg-Val-Arg-Phe-Ile-Gly-Asp-Ser-Val-Ala-Ala-Ile-Gly-Ile-Pro-Val-Asn-Lys-Ala-Ser-Leu-Ala-Gln-Tyr-Glu-Val-Leu-Ala-Asn-Tyr-Leu-Thr-Ser-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-Ser-Gly-Leu-Ile-Ser-Ser-Ala-Lys-Leu-Asp-Lys-Phe-Thr-Asp-Gly-Gly-Leu-Phe-Thr-Leu-Phe-Val-Arg-Asp-Gln-Asp-Ser-Ala-Val-Val-Ser-Ser-Asn-Ile-Lys-Lys-Ile-Val-Ala-Asp-Leu-Lys-Lys-Gly-Lys-Asp-Leu-Ser-Pro-Ala-Ile-Asn-Tyr-Thr-Lys-Leu-Lys-Asn-Ala-Val-Gln-Asn-Glu-Ser-Val-Ser-Ser-Pro-Ile-Glu-Leu-Asn-Phe-Asp-Ala-Val-Lys-Asp-Phe-Lys-Leu-Gly-Lys-Phe-Asn-Tyr-Val-Ala-Val-Gly-Asp-Val-Ser-Asn-Leu-Pro-Tyr-Leu-Asp-Glu-Leu

Cytochrom b (Nobrega & Tzagaloff, 1980):

Met-Ala-Phe-Arg-Lys-Ser-Asn-Val-Tyr-Leu-Ser-Leu-Val-Asn-Ser-Tyr-Ile-Ile-Asp-Ser-Pro-Gln-Pro-Ser-Ser-Ile-Asn-Tyr-Trp-Trp-Asn-Met-Gly-Ser-Leu-Leu-Gly-Leu-Cys-Leu-Val-Ile-Gln-Ile-Val-Thr-Gly-Ile-Phe-Met-Ala-Met-His-Tyr-Ser-Ser-Asn-Ile-Glu-Leu-Ala-Phe-Ser-Ser-Val-Glu-His-Ile-Ile-Arg-Asp-Val-His-Asn-Gly-Tyr-Ile-Leu-Arg-Tyr-Leu-His-Ala-Asn-Gly-Ala-Ser-Phe-Phe-Phe-Met-Val-Met-Phe-Met-His-Met-Ala-Lys-Gly-Leu-Tyr-Tyr-Gly-Ser-Tyr-Arg-Ser-Pro-Arg-Val-Thr-Leu-Trp-Asn-Val-Gly-Val-Ile-Ile-Phe-Ile-Leu-Thr-Ile-Ala-Thr-Ala-Phe-Leu-Gly-Tyr-Cys-Cys-Val-Tyr-Gly-Gln-Met-Ser-His-Trp-Gly-Ala-Thr-Val-Ile-Thr-Asn-Leu-Phe-Ser-Ala-Ile-Pro-Phe-Val-Gly-Asn-Asp-Ile-Val-Ser-Trp-Leu-Trp-Gly-Gly-Phe-Ser-Val-Ser-Asn-Pro-Thr-Ile-Gln-Arg-Phe-Phe-Ala-Leu-His-Tyr-Leu-Val-Pro-Phe-Ile-Ile-Ala-Ala-Met-Val-Ile-Met-His-Leu-Met-Ala-Leu-His-Ile-His-Gly-Ser-Ser-Asn-Pro-Leu-Gly-Ile-Thr-Gly-Asn-Leu-Asp-Lys-Ile-Pro-Met-His-Ser-Tyr-Phe-Ile-Phe-Lys-Asp-Leu-Val-Thr-Val-Phe-Leu-Phe-Met-Leu-Ile-Leu-Ala-Leu-Phe-Val-Phe-Tyr-Ser-Pro-Asn-Thr-Leu-Gly-His-Pro-Asp-Asn-Tyr-Ile-Pro-Gly-Asn-Pro-Leu-Val-Thr-Pro-Ala-Ser-Ile-Asp-Pro-Glu-Trp-Tyr-Leu-Leu-Pro-Phe-Tyr-Ala-Ile-Leu-Arg-Ser-Ile-Pro-Asp-Lys-Leu-Leu-Gly-Val-Ile-Thr-Met-Phe-Ala-Ala-Ile-Leu-Val-Leu-Leu-Val-Leu-Pro-Phe-Thr-Asp-Ala-Ser-Val-Val-Arg-Gly-Asn-Thr-Phe-Lys-Val-Leu-Ser-Lys-Phe-Phe-Phe-Phe-Ile-Phe-Val-Phe-Asn-Phe-Val-Leu-Leu-Gly-Gln-Ile-Gly-Ala-Cys-His-Val-Glu-Val-Pro-Tyr-Val-Leu-Met-Gly-Gln-Ile-Ala-Thr-Phe-Ile-Tyr-Phe-Ala-Tyr-Phe-Leu-Ile-Ile-Val-Pro-Val-Ile-Ser-Thr-Ile-Glu-Asn-Val-Leu-Phe-Tyr-Ile-Gly-Arg-Val-Asn

Cytochrom c₁ (Sadler et al., 1984):

Met-Thr-Ala-Ala-Glu-His-Gly-Leu-His-Ala-Pro-Ala-Tyr-Ala-Trp-Ser-His-Asn-Gly-Pro-Phe-Glu-Thr-Phe-Asp-His-Ala-Ser-Ile-Arg-Arg-Gly-Tyr-Gln-Val-Tyr-Arg-Glu-Val-Cys-Ala-Ala-Cys-His-Ser-Leu-Asp-Arg-Val-Ala-Trp-Arg-Thr-Leu-Val-Gly-Val-Ser-His-Thr-Asn-Glu-Glu-Val-Arg-Asn-Met-Ala-Glu-Glu-Phe-Glu-Tyr-Asp-Asp-Glu-Pro-Asp-Glu-Gln-Gly-Asn-Pro-Lys-Lys-Arg-Pro-Gly-Lys-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ile-Pro-Gly-Pro-Tyr-Pro-Asn-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Ala-Ala-Asn-Gln-Gly-Ala-Leu-Pro-Pro-Asp-Leu-Ser-Leu-Ile-Val-Lys-Ala-Arg-His-Gly-Gly-Cys-Asp-Tyr-Ile-Phe-Ser-Leu-Leu-Thr-Gly-Tyr-Pro-Asp-Glu-Pro-Pro-Ala-Gly-Val-Ala-Leu-Pro-Pro-Gly-Ser-Asn-Tyr-Asn-Pro-Tyr-Phe-Pro-Gly-Gly-Ser-Ile-Ala-Met-Ala-Arg-Val-Leu-Phe-Asp-Asp-Met-Val-Glu-Tyr-Glu-Asp-Gly-Thr-Pro-Ala-Thr-Thr-Ser-Gln-Met-Ala-Lys-Asp-Val-Thr-Thr-Phe-Leu-Asn-Trp-Cys-Ala-Glu-Pro-Glu-His-Asp-Glu-Arg-Lys-Arg-Leu-Gly-Leu-Lys-Thr-Val-Ile-Ile-Leu-Ser-Ser-Leu-Tyr-Leu-Leu-Ser-Ile-Trp-Val-Lys-Lys-Phe-Lys-Trp-Ala-Gly-Ile-Lys-Thr-Arg-Lys-Phe-Val-Phe-Asn-Pro-Pro-Lys-Pro-Arg-Lys

Eisen-Schwefel-Protein (Beckmann et al., 1987):

Lys-Ser-Thr-Tyr-Arg-Thr-Pro-Asn-Phe-Asp-Asp-Val-Leu-Lys-Glu-Asn-Asn-Asp-Ala-Asp-Lys-Gly-Arg-Ser-Tyr-Ala-Tyr-Phe-Met-Val-Gly-Ala-Met-Gly-Leu-Leu-Ser-Ser-Ala-Gly-Ala-Lys-Ser-Thr-Val-Glu-Thr-Phe-Ile-Ser-Ser-Met-Thr-Ala-Thr-Ala-Asp-Val-Leu-Ala-Met-Ala-Lys-Val-Glu-Val-Asn-Leu-Ala-Ala-Ile-Pro-Leu-Gly-Lys-Asn-Val-Val-Val-Lys-Trp-Gln-Gly-Lys-Pro-Val-Phe-Ile-Arg-His-Arg-Thr-Pro-His-Glu-Ile-Gln-Glu-Ala-Asn-Ser-Val-Asp-Met-Ser-Ala-Leu-Lys-Asp-Pro-Gln-Thr-Asp-Ala-Asp-Arg-Val-Lys-Asp-Pro-Gln-Trp-Leu-Ile-Met-Leu-Gly-Ile-Cys-Thr-His-Leu-Gly-Cys-Val-Pro-Ile-Gly-Glu-Ala-Gly-Asp-Phe-Gly-Gly-Trp-Phe-Cys-Pro-Cys-His-Gly-Ser-His-Tyr-Asp-Ile-Ser-Gly-Arg-Ile-Arg-Lys-Gly-Pro-Ala-Pro-Leu-Asn-Leu-Glu-Ile-Pro-Ala-Tyr-Glu-Phe-Asp-Gly-Asp-Lys-Val-Ile-Val-Gly

Untereinheit VI^(14.5) (van Loon et al., 1984):

Glu-Asp-Asp-Asp-Asn-Glu-Gln-His-Glu-Glu-Lys-Ala-Ala-Glu-Gly-Glu-Glu-Lys-Glu-Glu-Glu-Asn-Gly-Asp-Glu-Asp-Glu-Asp-Glu-Asp-Glu-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Glu-Asp-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Val-Thr-Asp-Gln-Leu-Glu-Asp-Leu-Arg-Glu-His-Phe-Lys-Asn-Thr-Glu-Glu-Gly-Lys-Ala-Leu-Val-His-His-Tyr-Glu-Glu-Cys-Ala-Glu-Arg-Val-Lys-Ile-Gln-Gln-Gln-Gln-Pro-Gly-Tyr-Ala-Asp-Leu-Glu-His-Lys-Glu-Asp-Cys-Val-Glu-Glu-Phe-Phe-His-Leu-Gln-His-Tyr-Leu-Asp-Thr-Ala-Thr-Ala-Pro-Arg-Leu-Phe-Asp-Lys-Leu-Lys

Untereinheit VII^(14.4) (De Haan et al., 1984):

Pro-Gln-Ser-Phe-Thr-Ser-Ile-Ala-Arg-Ile-Gly-Asp-Tyr-Ile-Leu-Lys-Ser-Pro-Val-Leu-Ser-Lys-Leu-Cys-Val-Pro-Val-Ala-Asn-Gln-Phe-Ile-Asn-Leu-Ala-Gly-Tyr-Lys-Lys-Leu-Gly-Leu-Lys-Phe-Asp-Asp-Leu-Ile-Ala-Glu-Glu-Asn-Pro-Ile-Met-Gln-Thr-Ala-Leu-Arg-Arg-Leu-Pro-Glu-Asp-Glu-Ser-Tyr-Ala-Arg-Ala-Tyr-Arg-Ile-Ile-Arg-Ala-His-Gln-Thr-Glu-Leu-Thr-His-His-Leu-Leu-Pro-Arg-Asn-Gln-Trp-Ile-Lys-Ala-Gln-Glu-Asp-Val-Pro-Tyr-Leu-Leu-Pro-Tyr-Ile-Leu-Glu-Ala-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu-Asp-Asn-Ile-Glu-Val-Ser-Lys

Untereinheit VIII^(12.3) (Maarse & Grivell, 1987):

Gly-Pro-Pro-Ser-Gly-Lys-Thr-Tyr-Met-Gly-Trp-Trp-Gly-His-Met-Gly-Gly-Pro-Lys-Gln-Lys-Gly-Ile-Thr-Ser-Tyr-Ala-Val-Ser-Pro-Tyr-Ala-Gln-Lys-Pro-Leu-Gln-Gly-Ile-Phe-His-Asn-Ala-Val-Phe-Asn-Ser-Phe-Arg-Arg-Phe-Lys-Ser-Gln-Phe-Leu-Tyr-Val-Leu-Ile-Leu-Arg-Glu-Phe-Ile-Gly-Thr-Gly-Gly-Arg-Thr-Val-Thr-Ser-Ile-Met-Asn-Phe-Cys-Thr-Ala-Lys-Leu-Val-Glu-Lys-Ser-Trp-Lys-Glu-Leu-Met-Phe-Asn-Ile-Val-Ser-Met-Pro-Leu-His-Tyr-Ile-Asp-Leu-Leu-Ile-Phe

Untereinheit IX(X)^{(7.3)°} (J. Phillips & B.L. Trumpower, persönliche Mitteilung):

Ser-Phe-Ser-Ser-Leu-Tyr-Lys-Thr-Phe-Phe-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Phe-Val-Gly-Thr-Ile-Phe-Ala-Gly-Ala-Phe-Val-Phe-Gln-Thr-Val-Phe-Asp-Thr-Ala-Ile-Thr-Ser-Trp-Tyr-Glu-Asn-His-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Trp-Lys-Asp-Val-Lys-Ala-Arg-Ile-Ala-Ala-Gly-Asp-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp-Glu

°: Es ist unklar, ob der Hefe-bc₁-Komplex aus 9 oder 10 Untereinheiten besteht; die 7.3-kDa-Untereinheit ist demnach entweder die Untereinheit IX oder X.

Anhang II: Vergleich der homologen Untereinheiten der bc₁-Komplexe aus Rinderherz und Hefe

	M _r	N _{AS}	+	-	Ladung	A(%)	P(%)	H(%)
"Core" I	47 kDa 48 347	441	42	47	5 -	7.7	44.9	37.6
"Core" II	45 kDa 38 704	352	44	46	2 -	9.1	44.9	39.2
"Core" I + II			≈80 86	≈90 93	7 -	9 8.3	43 44.9	40 38.3
Cyt. b	43 846 44 668	379 384	18 16	17 14	0 1 +	13.7 16.7	28.8 27.9	47.8 50.8
Cyt. c ₁	27 902 28 386	241 248	27 28	29 31	2 - 3 -	10.8 10.9	41.1 42.3	33.2 32.3
ISP	21 708 20 271	196 185	25 19	24 22	1 + 3 -	8.2 8.1	42.9 40.5	34.2 36.8
VI ("QP-C")	13 389	110	24	21	2 +	10.9	55.5	29.1
VII	14 433	126	16	18	3 -	8.1	40.5	36.8
VII	9 507	81	14	5	9 +	14.8	43.2	33.3
VIII	12 326	108	12	4	8 +	15.7	37.0	38.0
VIII ("hinge")	9 172	78	11	24	13 -	2.6	57.7	25.6
VI	14 528	122	11	55	44 -	5.7	69.7	19.7
IX ?°	7 998	78	9	3	5 +	2.6	30.8	46.2
X	7 189	62	9	6	3 +	14.5	41.9	41.9
IX/X°	7 345	65	8	9	1 -	18.5	44.6	38.5
XI	6 363	56	8	4	4 +	12.5	39.3	39.3
-								

Bei jeder Untereinheit gibt die obere Zeile die Zusammensetzung der Rinderherz-Untereinheit an, die untere Zeile die Zusammensetzung der Hefe-Untereinheit.

M_r: Molekulare Masse, aus der Sequenz abgeleitet oder aus SDS-Gelel abgesehäztzt; N_{AS}: Anzahl der Aminosäuren; +,-: Anzahl positiver bzw. negativer Reste; Ladung: Nettoladung; A(%): Anteil aromatischer Reste; P(%): Polarity-Index nach Vanderkooi & Capaldi (1972); H(%): Anteil hydrophober Aminosäuren (Alanin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Valin).

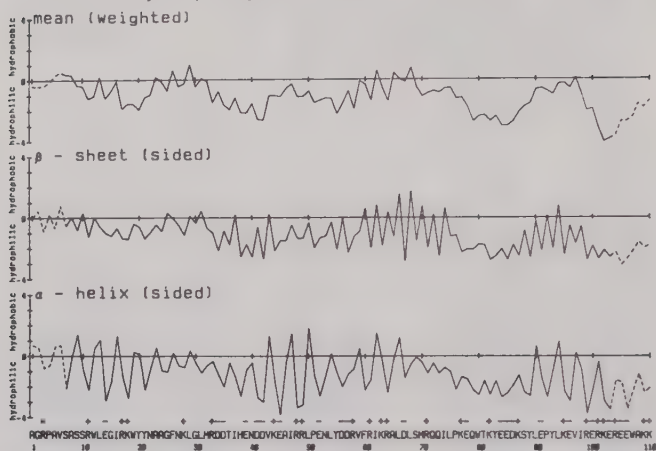
°: Es ist unklar, ob der Hefe-bc₁-Komplex aus 9 oder 10 Untereinheiten besteht; die 7.3-kDa-Untereinheit ist demnach entweder die Untereinheit IX oder X.

Anhang III: Vergleich der Sequenzen der vier homologen kleinen Untereinheiten der bc₁-Komplexe von Rinderherz (r) und Hefe (sc)

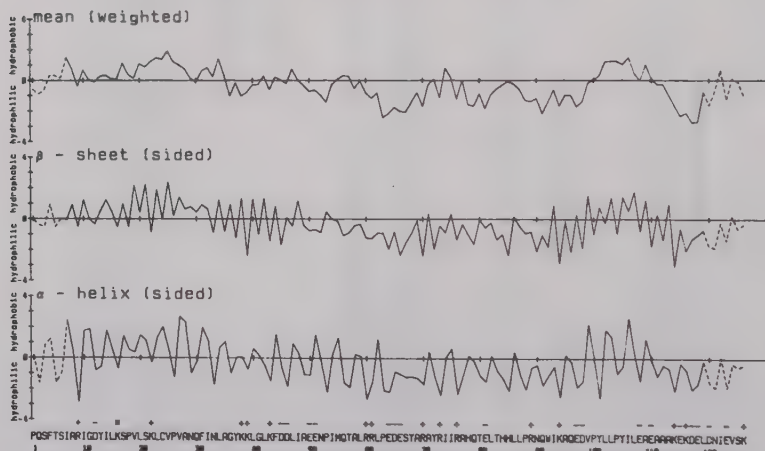
Anhang IV: "Sided"-Hydrophathie-Plots der kleinen Untereinheiten der bc_1 -Komplexe aus Rinderherz und Hefe.

Bei den vier homologen Untereinheiten aus Rinderherz und Hefe entspricht die Anordnung der "sided"-Hydrophathie-Plots der Ausrichtung der Sequenzen (s. Anhang III).

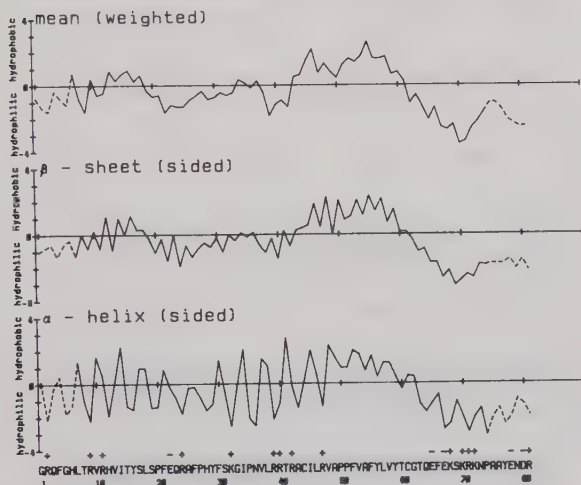
Sided - Hydropathy - Profiles of QPCb



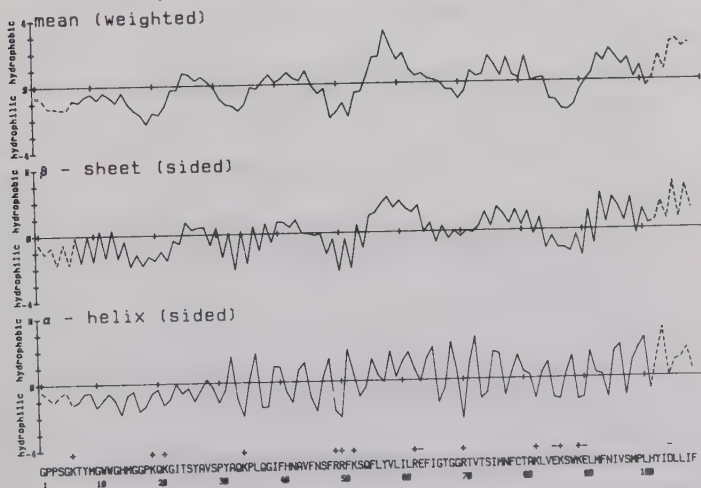
Sided - Hydropathy - Profiles of P14Ksc



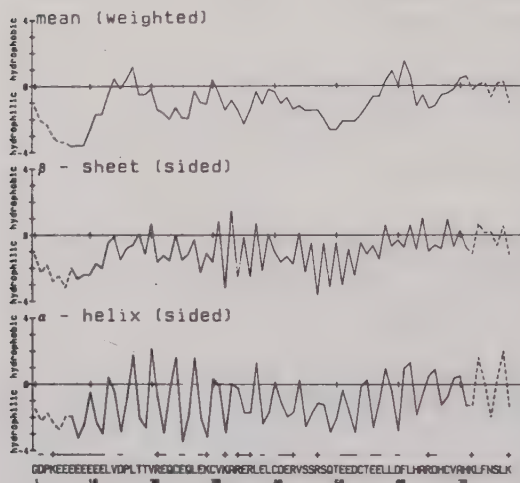
Sided - Hydropathy - Profiles of D9500



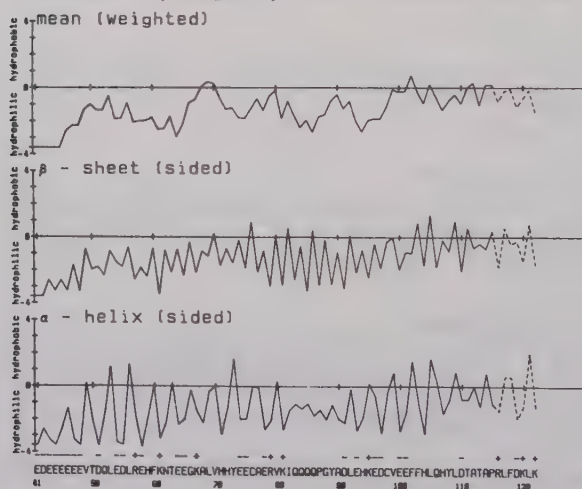
Sided - Hydropathy - Profiles of 12.3Ksc



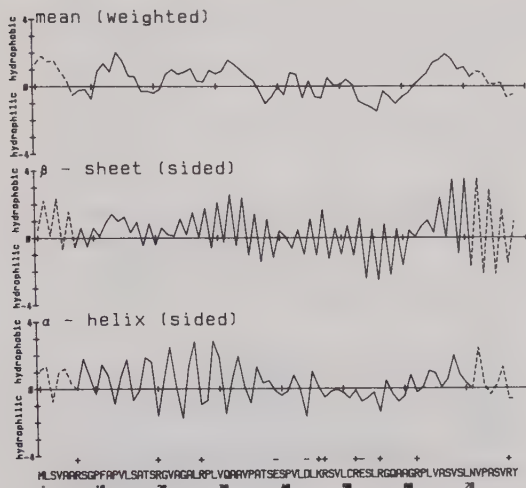
Sided - Hydropathy - Profiles of D9200



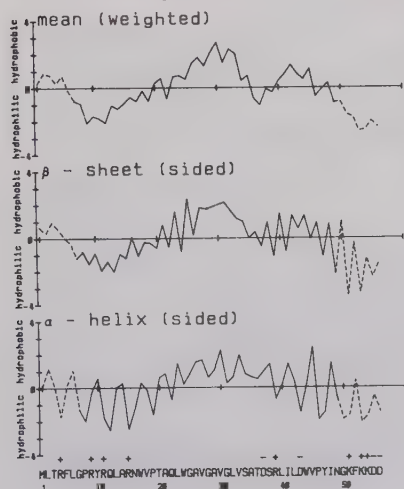
Sided - Hydropathy - Profiles of P17Ksc



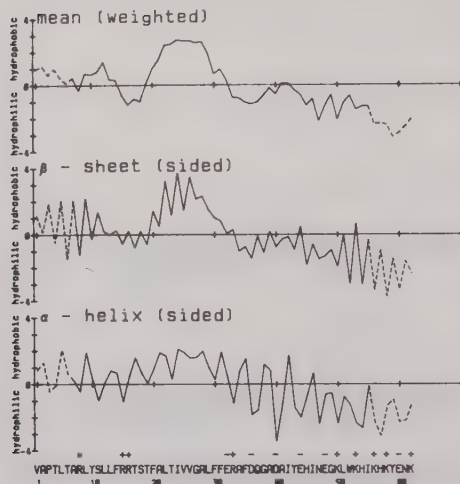
Sided - Hydropathy - Profiles of D8000



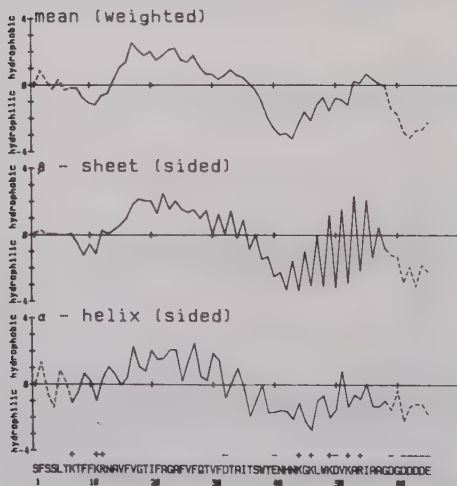
Sided - Hydropathy - Profiles of D6400



Sided - Hydropathy - Profiles of D7200



Sided - Hydropathy - Profiles of 7.3Ksc



Lebenslauf

- 22.10.1956 geboren als Sohn von Heinrich J. Link und Martha Link, geb. Eigenwillig, in Frankfurt/Main
- 1963-1965 Besuch der Günthersburgschule in Frankfurt/Main
- 1965-1966 Besuch der Heinrich-Seliger-Schule in Frankfurt/Main
- 1966-1974 Besuch des Wöhler-Gymnasiums in Frankfurt/Main
- Mai 1974 Abitur
- Oktober 1974 Beginn des Chemiestudiums (Diplom) an der Freien Universität Berlin
- März 1977 Diplom-Vorprüfung
- Juli 1980 Diplom-Hauptprüfung
- Oktober 1980 -
Oktober 1981 Diplomarbeit bei Prof.Dr. J. Fuhrhop, Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin, Thema: "Zur Synthese monomolekularer Vesikel mit Viologen-Kopfgruppen"
- Mai 1982 Diplom (Chemie)
- November 1982 -
Juni 1988 Promotion bei Prof.Dr. G. von Jagow, Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Physikalische Biochemie (Direktor Prof.Dr. E.M. Klingenberg), Thema: "Zur Struktur des mitochondrialen bc_1 -Komplexes". Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft (bis März 1986) bzw. wissenschaftlicher Angestellter (20 Stunden, seit April 1986)

